

**Identifizierung und Charakterisierung
von Nuklearfaktor I - Bindestellen
im Genom des Mausadenovirus AdFL**

Angelika Huber-Mack



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554631_0014

Identifizierung und Charakterisierung
von Nuklearfaktor I - Bindestellen im Genom des
Mausadenovirus AdFL

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von
Angelika Huber - Mack

1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning

Tag der mündlichen Prüfung: 15.5.1987

Die folgenden Aussagen sind richtig oder falsch? Markieren Sie die richtige Antwort mit einem Kreuz (X) in der entsprechenden Spalte.

Aussage: Die Luft ist ein Gemisch aus verschiedenen Gasen.
Richtig oder falsch? (Markieren Sie mit X)

Aussage: Die Luft ist ein Gemisch aus Sauerstoff und Stickstoff.
Richtig oder falsch? (Markieren Sie mit X)

Aussage: Die Luft ist ein Gemisch aus Kohlendioxid und Sauerstoff.
Richtig oder falsch? (Markieren Sie mit X)

Aussage: Die Luft ist ein Gemisch aus Stickstoff und Sauerstoff.
Richtig oder falsch? (Markieren Sie mit X)

Aussage: Die Luft ist ein Gemisch aus Sauerstoff und Kohlendioxid.
Richtig oder falsch? (Markieren Sie mit X)

Aussage: Die Luft ist ein Gemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid.
Richtig oder falsch? (Markieren Sie mit X)

Aussage: Die Luft ist ein Gemisch aus Sauerstoff und Stickstoff.
Richtig oder falsch? (Markieren Sie mit X)

Meinen Eltern

Vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwig - Maximilians - Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung, die er mir während dieser Arbeit zuteil werden ließ.

Mein besonderer Dank gilt Frau G. Stelzer für ihre wertvolle Mitarbeit bei der Ausführung zahlreicher Versuche.

Herrn M. Meisterernst danke ich für die Zusammenarbeit bei der Bestimmung der Affinitätsunterschiede.

Frau I. Gander danke ich für die zur Verfügung gestellten Kernextrakte aus Schweineleber.

Herrn Dr. M. Lipp möchte ich für sein Engagement für den Arbeitskreis und für die Durchsicht des vorliegenden Manuskripts danken.

Herrn Dr. H. Ibelgaufs und Herrn T. Dobner danke ich für die Einweisung im Umgang mit dem Apple-Computer.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere beim "Frauenlabor" für das angenehme Arbeitsklima, ihre guten Ratschläge und die mir entgegengebrachte Geduld.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Adenoviren	1
1.2. DNA - Replikation von Adenoviren	3
1.3. Mausadenovirusstamm FL	5
1.4. Nuklearfaktor I - ein sequenzspezifisches DNA - bindendes Protein	7
2. MATERIAL	11
2.1. Bakterien, Plasmide und Zellen	11
2.2. Oligonukleotide	11
2.3. Mäuse	11
2.4. Enzyme	11
2.5. Chemikalien und sonstige Materialien	12
3. METHODEN	14
3.1. Zellkultur	14
3.1.1. Züchten von Mausfibroblasten	14
3.2. Präparation von Kernextrakten aus 3T3 - Zellen	14
3.3. Präparation von Mäuseorganen	16
3.4. Herstellung von Kernextrakten aus Organen der Maus	16
3.5. Nachweis von Proteinen	17
3.5.1. Proteinbestimmung mit Biorad Protein Assay Kit	17
3.5.2. Auftrennung von Proteinen in SDS - Harnstoff - Polyacrylamidgelen	18
3.5.3. Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen	19
3.5.3.1. Coomassie - Blau - Färbung	19
3.5.3.2. Silberfärbung	19

II

	Seite
3.6. Bakterienzüchtung	20
3.6.1. Vermehrung von Bakterien auf Agarplatten	21
3.6.2. Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur	21
3.6.3. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	21
3.6.4. Transformation von Bakterien	22
3.6.5. Aufbewahren von Bakterienstämmen	22
3.7. Klonieren von DNA in Plasmide	23
3.8. Identifizierung rekombinanter Plasmide	23
3.8.1. Schnellmethoden zur Isolierung und Charakterisierung von Plasmiden	23
3.8.2. Isolierung von Plasmid - DNA durch Dichtegradientenzentrifugation	24
3.8.3. Koloniehybridisierung	25
3.9. Enzymatische Reaktionen an freier DNA	26
3.9.1. Reinigung und Konzentrierung von DNA	26
3.9.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
3.9.3. Abspalten von 5'- Phosphatresten durch alkalische Phosphatase	28
3.9.4. Phosphorylierung von DNA - Fragmenten und Oligonukleotiden mit T4 - Polynukleotidkinase	28
3.9.5. Markierung von DNA durch Nick - Translation	30
3.9.6. Verknüpfung von DNA - Fragmenten durch T4 - Ligase	30
3.10. Charakterisierung von DNA	31
3.10.1. Auftrennung von DNA auf Agarosegelen	31
3.10.2. Isolierung und Reinigung von DNA - Fragmenten aus Agarosegelen	31
3.10.3. Reinigung synthetischer Oligonukleotide über Polyacrylamid- Harnstoffgele	32
3.10.4. Übertragung von DNA von Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter	33
3.10.5. DNA / DNA - Hybridisierung nach Southern	34
3.10.6. DNA - Sequenzierung nach Maxam und Gilbert	35
3.10.7. DNA - Sequenzierung nach dem Didesoxyverfahren	36
3.11. DNA - Proteinkomplexe	37
3.11.1. Nachweis durch Filterbindungstst	37
3.11.2. Elution der gebundenen DNA vom Nitrozellulosefilter	38
3.11.3. Nachweis im Gelretentionstest	38

III

	Seite
3.11.4. Quantifizierung der Gelbanden	39
3.11.5. DNase I - Footprint	40
3.11.6. Exonuklease III - Footprint	41
4. E R G E B N I S S E	43
4.1. Verwendung von Kernextrakten für DNA - Proteinbindungsstudien	43
4.2. Identifizierung sequenzspezifischer Bindestellen für Nuklearfaktor I im Genom des Mausadenovirus AdFL	43
4.2.1. Isolierung von NF I - bindenden DNA - Fragmenten durch Filterbindungstests	43
4.2.2. Nachweis von NF I - Bindestellen durch Footprintanalysen	46
4.2.2.1. DNase - Footprint	46
4.2.2.2. Exonuklease III - Footprint	49
4.3. Untersuchungen zur DNA - bindenden Aktivität von NF I im Gelretentionstest	52
4.3.1. Nachweis der Spezifität der Bindung durch Kompetitionstest	56
4.4. Untersuchungen zur Affinität von NF I an die Bindestellen im rechten Ende von AdFL	58
4.4.1. Vergleich der Bindestellen durch Filterbindungstest	58
4.4.2. Ermittlung der Affinitätsunterschiede im Gelretentionstest	60
4.5. Nachweis der Bindung von NF I an längere DNA - Fragmente aus AdFL	68
4.5.1. Isolierung und Klonierung von DNA - Fragmenten mit NF I - Bindestellen	68
4.5.2. Charakterisierung der DNA - Proteinkomplexe im Gelretentionstest	69
4.6. Einfluß der flankierenden Sequenzen der Bindestellen auf die Bindung von NF I	73
4.6.1. Klonierung des Oligonukleotids E ₁ E ₂ in pUC8	73
4.6.2. Vergleich der Bindung von NF I an DNA - Fragmente mit originaler und veränderter Umgebung im Gelretentionstest	75

IV

	Seite
4.7. Vorkommen von NF I in verschiedenen Geweben der Maus	76
4.8. Einfluß von ATP auf die Bindung von NF I an DNA	79
5. DISKUSSION	81
5.1. NF I - Bindestellen im Genom des Mausadenovirus AdFL	81
5.2. Affinität von NF I an die Bindestellen im rechten Ende des AdFL - Genoms	81
5.3. Vergleich der Bindung von NF I an Oligonukleotide und DNA - Fragmente	85
5.4. Gewebespezifische Abhängigkeit der NF I - Menge	87
5.5. Funktionelle Aspekte	88
6. ZUSAMMENFASSUNG	90
7. ANHANG	91
7.1. Restriktionskarte von Mausadenovirus FL	91
7.2. DNA - Sequenz der Enden von Mausadenovirus FL	92
8. LITERATURVERZEICHNIS	93

<u>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</u>	Seite
Abb. 1.1. DNA - Sequenz der umgekehrten terminalen Repetitionen von Adenoviren	2
Abb. 1.2. Modell für die Adenovirus - Replikation nach Lechner und Kelly	4
Abb. 4.1. Autoradiogramm der nach Filterbindungstest eluierten AdFL - Restriktionsfragmente	45
Abb. 4.2. Schematische Darstellung der von NF I gebundenen AdFL - Fragmente	45
Abb. 4.3. Plasmid pGA 613	47
Abb. 4.4. DNase - Footprint des rechten Endes von AdFl - DNA	48
Abb. 4.5. Exonuklease III - Footprint des rechten Endes von AdFL	50
Abb. 4.6. Darstellung der im Exonuklease III - Footprint entstehenden Fragmente	51
Abb. 4.7. Im Gelretentionstest eingesetzte Oligonukleotide	53
Abb. 4.8. Beispiel für einen Gelretentionstest	55
Abb. 4.9. Kompetitionstest zum Nachweis der Bindungsspezifität	57
Abb. 4.10. Vergleich der Affinität der beiden NF I - Bindestellen im Filterbindungstest	59
Abb. 4.11. Bestimmung der Affinitätsunterschiede von NF I an Oligonukleotide	64
Abb. 4.12. Graphische Darstellung der im Gelretentionstest ermittelten Affinitätsunterschiede	65
Abb. 4.13. Gel zur Bestimmung von c_p^0	66
Abb. 4.14. Vergleich der Bindungseigenschaften von NF I mit Fragmenten und Oligonukleotiden	70
Abb. 4.15.a Kompetition des Sma I/Eco RI - Fragments	72
Abb. 4.15.b + c Kompetition des Sma I/Hind III - Fragments	72
Abb. 4.16. Klonierung von E_1E_2 in pUC8	74
Abb. 4.17. Vergleich der Fragmente im Kompetitionstest	76
Abb. 4.18. Analyse der Extrakte in einem denaturierenden PAA-Gel	77

VI

Abb. 4.19	Vergleich der Menge an NF I in verschiedenen Geweben der Maus	78
Abb. 4.20.	Einfluß von ATP auf die Bindung von NF I	80
Tab. 4.1.	Berechnung von c_k und c_o aus einem ausgewerteten Gelretentionstest	63
Tab. 4.2.	Auswertung des Proteinbestimmungsgels zur Berechnung von c_p^0	67
Tab. 4.3.	Auswertung des Kompetitions gel	78

VII

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Ad2, Ad5	Adenovirus Typ 2, bzw. 5
AdFl	Mausadenovirus Typ FL
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
Ci	Curie (1 Ci = 3.7×10^{10} Bequerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
NF I	Nuklearfaktor I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dd NTP	2',3'- Didesoxyribonukleosid- triphosphat
ITR	umgekehrte terminale Repetition bei Adenoviren
K	Kilodalton
kb	Kilobasen
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
OD	Optische Dichte
Pbs-d	Phosphat - gepufferte Salzlösung
rpm	Umdrehungen pro Minute
U	Enzymeinheiten
UV	Ultraviolett
V	Volt

1. EINLEITUNG

1.1. Adenoviren

(Übersichtsartikel: Flint, 1981)

Adenoviren gehören zu einer Gruppe von DNA - Viren und wurden erstmals vor mehr als 30 Jahren aus dem Respirationstrakt verschiedener Tierarten isoliert (Rowe et al., 1953; Hilleman und Werner, 1954). Mittlerweile sind mehr als 80 verschiedene Serotypen, die in Vertebraten gefunden wurden, charakterisiert worden. Über die Hälfte davon sind menschliche Viren, die nach ihrer Onkogenität, der DNA - Homologie innerhalb der Gruppe und ihrer Basenzusammensetzung in 5 - 7 Gruppen eingeteilt werden (Green et al., 1979). Beim Menschen können diese Viren Infektionen des Respirationstrakts und Augenerkrankungen verursachen, einige Stämme besitzen zudem onkogenes Potential in neugeborenen Hamstern.

Ihrer Morphologie nach sind Adenoviren hüllenlose Viren von ikosaedraler Struktur.

Ihr Genom besteht aus einem mit mindestens vier Proteinen assoziierten, linearen doppelsträngigen DNA - Molekül von 20 - 25 x 10⁶ Dalton.

Die Virusvermehrung und Reifung findet im Kern der infizierten Zelle statt. Der Infektionszyklus läuft in zwei Phasen ab, einer frühen Phase (0 - 6 Stunden nach der Infektion), in der die Wirtszelle auf die virale DNA - Vermehrung vorbereitet wird, und einer späten Phase (bis ca. 24 Stunden nach der Infektion), in der vor allem die Expression der Strukturproteine stattfindet und gleichzeitig die zellulären Funktionen weitgehend unterdrückt werden. In dieser Phase wird die virale DNA in 5 x 10⁵ Kopien pro Zelle repliziert.

Adenoviren stellen auf Grund ihrer Größe - zum einen ist die DNA - Struktur überschaubar, andererseits liegt eine ausreichend hohe genetische Komplexität vor - ein geeignetes Modellsystem für Untersuchungen der biochemischen Vorgänge und Regulationsprozesse in eukaryontischen Zellen dar.

AD2	CA TCATC- <u>ATAATATACCTTATTT</u> ---TTGGATT- <u>GAAGCCAAATATGATATGAGGGGGTGGAGTTTGTGAGCTTGCGGCGCGCTGG</u>	
AD5	CA TCATCATAATATACCTTATTT---TTGGATT- <u>GAAGCCAAATATGATATGAGGGGGTGGAGTTTGTGAGCTTGCGGCGCGCTGG</u>	
AD3	CTATCTATATATATACCTTATAG-ATGGAT- <u>CGTGCCAACTATATATGAGGGTATTTTAAAAAAGTGGCGCGCTGTGTGTGGTGATTT</u>	
AD7	CTCTCTATATATATACCTTATAG-ATGGAT- <u>CGTGCCAACTATATATGAGGGTATTTTAAAAAAGTGGCGCGCTGTGTGTGGTGATTT</u>	
AD4	CTCTCTGTATATATACCTTATTTTTTTGTG-TGAGTTTATATATGCCATATGCGGATGCGGATTTTGGGATGCGGCGCGCTGATTTG	
AD9	CTATCTATATATATACCTACCAAAATGATACA-AAAGTTTATATATGCAATGAGCTTTTGAATTTTAAAGGTTTGGGGGGAGCCA	
AD10	CTTCA TCATATATATACCTACCAAAATGATACA-AAAGTTTATATATGCAATGAGCTTTTGAATTTTAAAGGTTTGGGGGGAGCCA	
AD12	CA TCATCATAATATACCTTATA---CTGGATT-AGTGCCAAATATATATATGCAATGAGCTTTTGAATTTTGAATTTGGGTGGAGG	
AD18	CA TCATCATAATATACCTTATA---CTGGACT-AGAGCCAAATATATATATGCAATGAGCTGGCGGATGTACTTTGTATTTGGGTGGAG	
AD31	CA TCATCATAATATACCTTACA---CTGGACT-TGAGCCAAATATATATATGCAATGAGCTGGCGGAGTGAATAGTAAATGCAAGCTTGGC	
SA7	CA TCATCATAATATACCTTATTT---TTGGCAAGCGGTGCCAATATATGCTTAAAGCTGGCGGAGTTTGGTGAGCTATGCGGAAATGG	
TAV	CA TCATCATAATATACCTGACACTTTTGAAGCT-----AAATGAGCTTGGCAAGTCCCAAGTGGCTTTGTGTCCCACTGTGTTTGG	
ADFL	CA TCATCATAATATATAG---A-----GTTAGCA- <u>AAAAATGG</u> CGCTTTGTGTGGCTTTGTGTCCCACTGTGTTTGG	
CELO	GATGATGTATATATA--ACGTCAAAA-----ACTAAAGCTAGTCAATAACCGGCCATACCGGAGCGGTGTGGC - 63	
AD2	GAACGGCGCGGTGAGCTAG - 102	
AD5	GAACGGCGCGGTGAGCTAG - 103	
AD3	GGCTGGGGGTTAAAGGGTAAGGGGCGCGGAGAGCTGGGAAATGAGCT - 136	
AD7	GGCTGTGGGGTGAATGACTAATGAGGGCGCGCGGTGGGAAATGAGCT - 136	
AD4	GCTGTGACAGCGGGTTGGTTAGGGGCGGGG- - 116 - CAGGTGAGCTTTTGCAT / TAACTGATGCTTTAA	
AD9	AGCCTGATTTGACAGAGAAGAGAGATGCAAAATGAGCTTCAAGACAGCGCTAAAGGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG - 158	
AD10	AGCCTGATTTGACAGAGAAGAGAGATGCAAAATGAGCTTCAAGACAGCGCTAAAGGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG - 135	
AD12	TGTGGCTTTGGCGTGTCTTGAATGTTTGGGGGATGAGGAGTGGGGCGCGCGGTGGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCT - 162	
AD18	GTGTGGCGTGGGGCTGTGTTGTAGTTTGGGCGGATGAGGAGTGTGGCGCGCGCGGTGGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCT - 165	
AD31	GTGGTTTGCAGATTTTGGCGAAGCGGATGTGAGCGGTGTGGGAGCT - 148	
SA7	CGGAGTTAGCGCGCGCGGTTTGGCGGTAGCGGTGGCT.....	
TAV	TTTGTGAGCTTTTGGAGCGGGCTTTTGGCGCGGGTTCCAGATTTTGGGGCGGTTTCCGAGAGAGAGCTTTGAGTCAATACAGCTCAAGCGCGG - 161	
ADFL	CGCGAGTTTGGCTTTTGGTTTTCGCGGG - 93	

Abb.1.1.

DNA - Sequenz der umgekehrten terminalen Repetitionen von Adenoviren
(aus Fütterer und Winnacker, 1984)

Ad2 - Ad31 sind menschliche Serotypen, SA7 ist ein Affen - Serotyp, TAV ein
Tupaja - Adenovirus, AdFL ein Maus - Serotyp und CELO ein Vogel - Serotyp.
Homologe Bereiche sind durch Einboxen und Unterstreichen kenntlich gemacht.

1.2. DNA - Replikation von Adenoviren

(Übersichtsartikel: Friefeld et al., 1984; Fütterer und Winnacker, 1984)

Adenovirus - DNA ist an beiden 5' - Enden kovalent mit einem 55 K großen Protein (Terminales Protein TP) verknüpft. Die DNA besitzt eine umgekehrte terminale Repetition (ITR), deren Länge bei den einzelnen Serotypen zwischen 63 und 165 Basenpaaren schwankt, aber untereinander ausgeprägte Homologie aufweist (Tamanai und Stillman, 1983; Fütterer und Winnacker, 1984). Die Primärstruktur der ITR's ist für verschiedene Serotypen durch Sequenzierung bestimmt worden (Abb.1.1.).

Diese strukturellen Besonderheiten der Enden der Adenovirus - DNA sind von Bedeutung für den Mechanismus der DNA - Replikation. Initiations - und Terminationspunkt der Replikation liegen an den Moleküleenden. Die Replikation kann an beiden Enden des doppelsträngigen Genoms initiiert werden, und die Synthese des neuen Strangs erfolgt kontinuierlich in 5'→ 3' -Richtung, gleichzeitig wird ein Elteronstrang verdrängt (Typ I - Moleküle). Der verdrängte Einzelstrang dient seinerseits als Matritze für die Replikation, die am 3' - Ende beginnt und kontinuierlich zum 5' - Ende verläuft (Typ II - Moleküle). Es resultiert ein doppelsträngiges DNA - Molekül von voller Länge. (Abb.1.2.) Die in Abbildung 1.2. dargestellten Intermediate für die Initiation der Typ II - Replikation mit "Bratpfannenstruktur", die sich über die ITR's ausbilden könnten, sind bisher noch nicht nachgewiesen worden. Diese Struktur hat jedoch im doppelsträngigen Bereich große Ähnlichkeit mit den Typ II - Molekülen, so daß die Replikation nach dem gleichen Mechanismus initiiert werden könnte.

Alle bisher bekannten DNA - Polymerasen benötigen ein freies 3' - OH - Ende als Primer für die Initiation der Replikation, das meistens von kurzen RNA - Molekülen zur Verfügung gestellt wird, und sie synthetisieren den neuen Strang ausschließlich in 5'→ 3' - Richtung. Bei linearen Genomen, wie dem Adenovirusgenom, entsteht dabei das Problem, daß nach der enzymatischen Abspaltung des RNA - Primers ein Informationsverlust an den 5' - Enden

auftreten würde. Adenoviren umgehen diese Schwierigkeit nicht wie andere lineare Viren durch die Ausbildung von Konkaternen (Bakteriophage T7) oder "Hairpin - Strukturen" (Parvoviren), sondern durch sogenanntes "Protein - Priming" (Rekosh et al., 1977). Dabei bildet ein Serinrest des 80 K großen Vorläufers des Terminalen Proteins (pTP) in einer Template - abhängigen Reaktion mit dem α - Phosphatrest von dCMP, dem ersten Nukleotid in der neuen DNA - Kette, eine Phosphodiesterbindung aus. Diese Reaktion wird durch eine viruskodierte DNA - Polymerase katalysiert, die mit pTP assoziiert ist. Der Initiationskomplex (pTP - dCMP) liefert eine freie 3' - OH - Gruppe, von der aus die Elongation der DNA erfolgen kann. Das Protein bleibt kovalent an die DNA gebunden und wird im Verlauf der Infektion von einer viruskodierten Protease zum 55 K Protein prozessiert, das in Viruspartikeln gefunden wird.

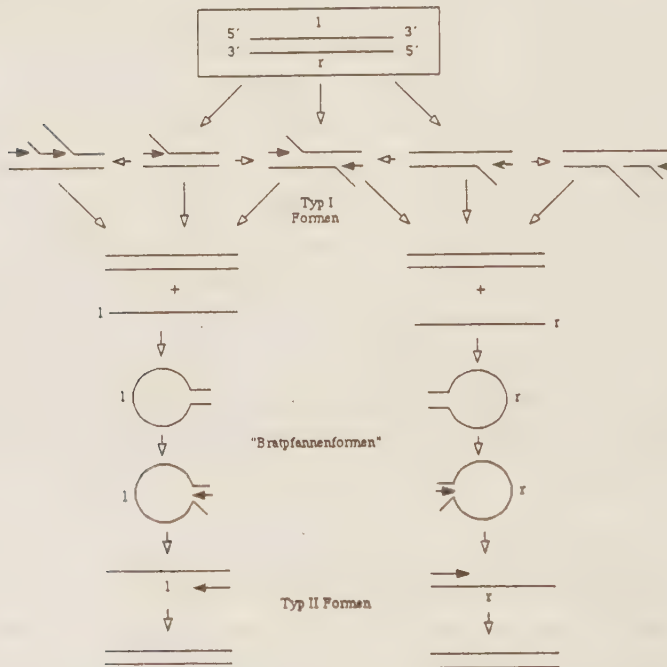


Abb. 1.2.
Modell für die Adenovirus - Replikation nach Lechner und Kelly, 1977
Erklärung des Modells im Text

Neben den beiden erwähnten Proteinen (pTP, Ad - Pol) ist noch ein weiteres virales Protein für die komplette Replikation erforderlich, das 72 K DNA - bindende Protein. Alle drei Proteine werden während der frühen Phase der Infektion exprimiert.

Zusätzlich zu den viruskodierten Proteinen sind an der Replikation von Adenoviren noch mindestens zwei zelluläre Faktoren - Nuklearfaktor I und II - beteiligt. Nuklearfaktor I stimuliert die Bildung des Initiationskomplexes und eine limitierte Elongation, während Nuklearfaktor II, ein Protein mit Topoisomerase - Aktivität, für die vollständige Elongation der DNA - Synthese nötig zu sein scheint (Nagata et al., 1983).

Kürzlich wurde ein drittes zelluläres Protein entdeckt, Nuklearfaktor III, das ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, die Adenovirus - Replikation stimuliert (Pruijn et al., 1986).

1.3. Mausadenovirusstamm Ad FL

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu DNA - Proteinbindungs - eigenschaften am System des Mausadenovirusstammes AdFL durchgeführt. Deshalb soll an dieser Stelle kurz auf die Besonderheiten dieses Virus eingegangen werden.

Der Mausadenovirusstamm AdFL wurde erstmals von Hartley und Rowe (1960) isoliert und klassifiziert. Eine Infektion mit AdFL verursacht in neugeborenen Mäusen schwere Krankheitsbilder und führt nach wenigen Tagen zum Tod.

Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene wurden zunächst von Larsen und Nathans (1977), Wigand (1977) und später auch von Antoine und Mitarbeitern (1982, 1984) durchgeführt. Im Vergleich zu den menschlichen Adenoviren ist über das Mäusevirus sehr wenig bekannt. So existiert beispielsweise bis heute keine Transkriptionskarte des Virus.

Die doppelsträngige DNA hat ein Molekulargewicht von ungefähr $19 - 20 \times 10^6$ Dalton (Larsen und Nathans 1977; Temple et al. 1981) und ist somit kleiner als

die der menschlichen Adenoviren. Die virale DNA weist alle adenovirus-spezifischen Strukturmerkmale auf: die 5'-Enden der DNA sind kovalent mit einem Protein verknüpft, ebenso besitzt die DNA die für Adenoviren typische invertierte terminale Repetition, die mit 93 bp kürzer ist als die der menschlichen Adenoviren (Larsen und Nathans, 1977; Temple et al. 1981). Sequenz-vergleiche mit den Enden der menschlichen Serotypen zeigten, daß die ersten 17 bp konserviert sind. Hybridisierungsstudien zwischen AdFL - DNA und Ad2 - DNA zeigten nur geringe Homologie der beiden Viren, im Gegensatz zu den ausgeprägten homologen Regionen, die innerhalb der meisten menschlichen Serotypen beobachtet wurden. Gegen menschliche Adenoviren gerichtete Antiseren zeigten jedoch mit AdFL eine Kreuzreaktion, was auf gemeinsame antigene Determinanten auf dem viralen Kapsid hinweist. Inzwischen wurden zwei Bereiche mit großer Homologie zwischen Ad2 und AdFL entdeckt, von denen einer auf dem Ad2 - Genom für das Hexon - Protein kodiert, der andere für das sogenannte Hexon - assoziierte Protein IVa₂ (Antoine et al. 1982; Larsen et al. 1979).

Die Vermehrung von AdFL ist streng auf Mäusezellen beschränkt, in nicht-permissiven Zellen (HeLa, etc.) findet keine Virusproduktion statt. Allerdings verläuft die Replikation der viralen DNA in HeLa - Zellen etwa mit der gleichen Effizienz wie in den permissiven 3T3 - Zellen. Der Defekt in der Virusproduktion scheint demnach an eine reduzierte Synthese der Strukturproteine, insbesondere des Hexon - Proteins, gebunden zu sein (Antoine, 1984).

1.4. Nuklearfaktor I - ein sequenzspezifisches DNA - bindendes Protein

Die Beteiligung eines zellulären Faktors an der DNA - Replikation von Adenoviren wurde erstmals 1981 nachgewiesen (Ikeda et al., 1981; Lichy et al., 1981). Die Isolierung dieses Faktors aus uninfizierten HeLa - Kernen gelang ein Jahr später, das Protein wurde Nuklearfaktor I (NF I) genannt (Nagata et al. 1982).

Durch DNAse - Footprint - Experimente konnte gezeigt werden, daß NF I sequenzspezifisch an eine konservierte Region von 25 - 30 bp Länge im Replikationsursprung von Ad2 - DNA bindet. Die genaue Erkennungssequenz wurde dann an Hand verschiedener Mutanten aufgeklärt (Leegwater et al. 1985). Sie umfaßt die Nukleotide 24 bis 39 des Ad2 - ITR und enthält zwei der vier konservierten Bereiche innerhalb der Repetition. Die annähernd rotations - symmetrische Erkennungssequenz hat die Konsensussequenz 5' - ²⁵TGGN₆GCCAA³⁸ - 3'.

Die Fähigkeit von NF I, durch die Bindung an diese Sequenz die Bildung des Initiationskomplexes und eine begrenzte Elongation zu stimulieren, wurde in einem in vitro Replikationssystem nachgewiesen (Guggenheimer et al., 1984). Während die ersten 18 - 20 bp der Ad - DNA für eine in vitro Replikation in begrenztem Umfang ausreichen, wird diese Aktivität durch die Anwesenheit der NF I - Bindestelle drastisch verstärkt. So repliziert ein Plasmid, das die ersten 40 bp der Adenovirus - Enden enthält, genauso effizient wie ein Plasmid mit dem gesamten ITR (Rawlins et al., 1984; Leegwater et al., 1985).

Punktmutationen innerhalb der Konsensussequenz hemmen die Bindung von NF I (De Vries et al., 1985; Schneider et al., 1986). Jedoch scheinen zusätzlich zur minimalen Erkennungssequenz auch flankierende Sequenzen für eine optimale Bindung von Bedeutung zu sein (De Vries et al., 1985; Leegwater et al., 1985).

Daß die NF I - Bindestelle auch in vivo ein essentieller Bestandteil des Replikationsursprungs von Adenoviren ist, zeigten Versuche, für die Minichromosomen mit zwei identischen Kopien von verschiedenen langen Deletionen der terminalen Ad - DNA - Fragmente konstruiert wurden. Im Gegensatz zu den in vitro Experimenten waren Templates, die nur die ersten 18

bp enthielten, in vivo vollständig inaktiv, während Templates mit den ersten 45 bp mehrere Replikationsrunden durchlaufen konnten (Hay, 1985).

Neben der NF I - Bindestelle im Adenovirus - ITR konnten homologe Elemente mit der symmetrischen Erkennungssequenz auch in zahlreichen anderen Systemen nachgewiesen werden.

Das sogenannte TGGCA - Protein, das zuerst aus Hühnerovidukt - Zellkernen und später auch aus anderen Hühnergeweben isoliert wurde, bindet spezifisch an flankierende Sequenzen 5' zum Lysozymgen des Huhns (Nowock und Sippel, 1982; Borgmeyer et al. 1984; Nowock et al. 1985). Die Erkennungssequenz dieses Proteins ist homolog zur NF I - Bindestelle. Es konnte gezeigt werden, daß die DNA - Bindungseigenschaften der beiden Proteine ununterscheidbar sind und daß das TGGCA - Protein NF I im in vitro Replikationssystem funktionell ersetzen kann (Leegwater et al., 1986).

Bindestellen für das TGGCA - Protein wurden auch in der Enhancer - Region des Papovavirus BKV, im LTR des Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) und in der terminalen Repetition von Ad 12 identifiziert (Nowock et al., 1985). Weitere DNA - bindende Proteine mit NF I - ähnlicher Bindungsspezifität wurden außerdem in Kernextrakten von Mäuseleber (Borgmeyer et al., 1984), in menschlichen KB - Zellen (Nowock et al., 1985) und in lymphoblastoiden Zellen (Siebenlist et al., 1984) entdeckt. Bindestellen für das lymphoblastoide Protein konnten sowohl 5' des menschlichen c - myc - Gens (Siebenlist et al., 1984) als auch 5' zur μ - switch - Region des menschlichen IgM - Gens (Henninghausen et al., 1985) nachgewiesen werden.

Kürzlich wurden mehrere NF I - Bindestellen in der Promoterregion und im ersten Intron des IE 1 - Gens des menschlichen Cytomegalovirus entdeckt (Henninghausen und Fleckenstein, 1986).

Da es bisher nicht gelang, ausreichende Mengen gereinigten Proteins zu isolieren, ist ein direkter Vergleich dieser Faktoren noch nicht möglich. Es scheint sich aber um eine Klasse hochkonservierter Proteine zu handeln, die evolutionär miteinander verwandt sind.

Abgesehen vom stimulierenden Einfluß von NF I auf die Adenovirus - Replikation, ist die biologische Funktion dieser Proteine unbekannt. Die Entdeckung von NF I - Bindestellen in HeLa - DNA, mit einer Häufigkeit, die dem durchschnittlichen Abstand der Replikationsursprungspunkte in Säugerzellen entspricht (eine je 100 -200 kb), läßt auf eine mögliche Beteiligung dieses Proteins an der eukaryotischen DNA - Replikation schließen (Gronostajski et al., 1984; 1985).

Das Vorkommen von Bindestellen in regulatorischen Bereichen von Genen wie c - myc oder des IE 1 - Gens impliziert jedoch eine universellere Bedeutung von NF I und seinen verwandten Proteinen.

Einige der bisher bekannten TGGCA - Erkennungssequenzen (Lysozymgen, c - myc, MMTV, IE 1) fallen mit DNase - hypersensitiven Bereichen der DNA zusammen, die mit einem aktiven Zustand des Chromatins korreliert sind. Aus dieser Tatsache wurde die Hypothese abgeleitet, daß die Bindung von NF I einen frühen Schritt in der Aktivierung des Chromatins darstellen und somit einen regulatorischen Effekt auf die Genexpression ausüben könnte. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse von Theisen und Mitarbeitern (1986) gestützt, die im gewebspezifischen Lysozym-Enhancer, der 6.1 kb 5' zur Transkriptionsstartstelle des Lysozymgens liegt, zwei Bindestellen des TGGCA-Proteins gefunden haben. Auch hier wurde eine Korrelation mit DNase-hypersensitiven Bereichen festgestellt. Allerdings kann auf Grund des ubiquitären Vorkommens dieses Proteins dessen Bindung allein nicht für die zellspezifische Aktivierung des Lysozymgens ausreichen.

Zur Zeit wird von verschiedenen Arbeitsgruppen vermutet, daß NF I mit anderen bekannten DNA - bindenden Proteinen identisch ist. So soll das sogenannte CAT - bindende Protein aus Rattenleberkernen, das durch die Bindung an die Pentanukleotidsequenz 5'- CCAAT - 3' in den Promoterregionen des HSV tk - Gens und im MSV - LTR, die Transkriptions - aktivität erhöht (Graves et al., 1986) mit NF I identisch sein (Tijan, 1986). Dies wurde aus der Beobachtung abgeleitet, daß beide Proteine in DNase - Footprintanalysen das gleiche Bandenmuster ergeben und für beide das selbe

Molekulargewicht ermittelt wurde. Zudem ist die Erkennungssequenz für das CAT - bindende Protein zur zweiten Hälfte der NF I - Bindestelle homolog.

Hübscher und Mitarbeiter fanden bei Untersuchungen an DNA - Polymerase α , daß sowohl das Holoenzym als auch eine 47 K große Untereinheit des Enzymkomplexes spezifisch an die NF I- Erkennungssequenz bindet (Hübscher, pers. Mitteilung).

Genauere Analysen dieser Daten stehen noch aus, jedoch deuten die bisherigen Arbeiten darauf hin, daß es sich bei NF I um ein multifunktionelles Protein handelt, das durch Bindung an bestimmte DNA - Sequenzen sowohl die DNA - Replikation als auch die Transkription mancher Gene beeinflußt.

Mittlerweile ist es in unserem Arbeitskreis gelungen, das Protein aus Schweine - leberkernextrakten so weit anzureichern, daß nun erste Peptidsequenzen vorliegen (Gander, pers. Mitteilung). Mit Hilfe von aus diesen Peptidsequenzen abgeleiteten Oligonukleotidsequenzen werden zur Zeit verschiedene c-DNA - Banken untersucht (Donath, pers. Mitteilung). Außerdem wird im Augenblick versucht, monoklonale Antikörper gegen NF I herzustellen. Man hofft so, bald nähere Erkenntnisse über Struktur und Funktion dieses interessanten Proteins zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Bindestellen für Nuklearfaktor I im Genom des Mausadenovirus AdFL identifiziert werden. Weiterhin sollten einige DNA - Bindungseigenschaften des Proteins unter Anwendung der Technik des Gelretentionstests untersucht werden.

2. MATERIAL

2.1. Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien

Die verwendeten Bakterienstämme *E. coli* DH 1 und JM 83, die Plasmide pBR 322, pUC8 und pUC12 wurden von der Stammsammlung des Arbeitskreises Prof. Winnacker zur Verfügung gestellt, ebenso NIH 3T3 - Zellen.

2.2. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Dr. R. Mertz (Genzentrum München) synthetisiert.

2.3. Mäuse

Die zur Organpräparation verwendeten Mäuse wurden von der Tierklinik der Universität München zur Verfügung gestellt.

2.4. Enzyme

Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Schwalbach; Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu - Isenburg sowie Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim bezogen.

Weitere Enzyme:

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Lysozym; alkalische Phosphatase; Ribonuklease A; T4 DNA Ligase; DNA - Polymerase I; DNaseI; RNase A; Exonuklease III

New England Biolabs, Schwalbach:

T4 DNA Ligase; T4 Polynukleotidkinase

E. Merck AG, Darmstadt: Proteinase K aus Pilzen

2.5. Chemikalien und sonstige Materialien

Amersham und Buchler, Braunschweig:

[γ - ^{32}P] ATP (3000 Ci / mmol)

[α - ^{32}P] dCTP (3000 Ci / mmol)

[α - ^{35}S] thio dATP (650 Ci / mmol)

Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu - Isenburg:

Agarose

J.T. Baker Chemical Co, Philipsburg, New Jersey, USA:

Cäsiumchlorid, Glycerol

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

ATP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP; ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP;

Chloramphenicol; d(I-C); Kalbsthymus - DNA

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Yeast-Extrakt

Kodak Limited:

Röntgenfilme XAR 5

E. Merck AG, Darmstadt:

Ammoniumacetat; Ammoniumperoxodisulfat (APS); Borsäure; Coomassie Brilliantblau R 230; Essigsäure p.A.; Ethanol; Ethidiumbromid; Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure (EDTA); Formamid; Formaldehyd; Glucose; Glycin; N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES); Harnstoff; Isoamylalkohol; Isopropanol; Kaliumchlorid; Kieselgel 60 F254 DC-Platten; Magnesiumchlorid; Methanol; Natriumacetat; Natriumchlorid; Natriumcitrat; Natriumdodecylsulfat (SDS); Phenol; Saccharose; Salzsäure p.A.; Tetramethylethyldiamin (TEMED); Trichloressigsäure (TCA); Triton X 100; Xylencyanol

Nunc GmbH, Wiesbaden:

Petrischalen; Zellkulturflaschen

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

2',3'-Dideoxyribonukleosid-triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP); Sephadex G50 fine

C.Roth, Karlsruhe: Dithiothreitol (DTT); Hydrazin; Piperidin

Schleicher und Schüll, Dassel:

Nitrocellulosefilter, BA - 85

Serva, Heidelberg:

Acrylamid; Glaswatte; 2-Mercaptoethanol (MeEtOH); N,N'-Methylen - bisacrylamid; Polyvinylpyrrolidon (PVP); Visking-Dialysesschläuche

Sigma Chemie, München:

Agarose Typ VII; Ampicillin; 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Thio-Galactopyranosid (X-Gal); Ficoll; Piperazin-N,N'-bis (2-ethansulfonsäure) (PIPES); Rinderserumalbumin; Spermidin; Tetracyclin; Tris-(hydroxy - methyl)-aminomethan (Tris); t-RNA aus Hefe

Whatman Ltd, Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA:

3 MM Papier; Glasfilter GF / C; Anionenaustauscher DE-52

Zinsser, Frankfurt:

Quickscent-501

3. **METHODEN**

3.1. Zellkultur

3.1.1. Züchten von Mausfibroblasten

Mausfibroblasten der Zelllinie NIH / 3T3 wurden in Plastikkulturflaschen (Nunc, 75 cm²) als Einschichtkultur bei 37°C gezüchtet. Als Nährmedium diente Dulbecco's Medium (Dulbecco und Freeman, 1959), dem 5% Serum von neugeborenen Kälbern zugesetzt worden war. Nach 3-4 Tagen war der Zellrasen zu 3 / 4 konfluent. Das Medium wurde abgegossen, die Zellen einmal mit Pbs-d (37°C) gewaschen und mit 1ml Trypsin inkubiert. Sobald sich die Zellen durch vorsichtiges Anschlagen der Flasche vom Boden lösten, wurden 1-2 ml neues Medium dazugegeben und in eine neue Kulturflasche mit Medium übertragen. Die Passagen erfolgten im allgemeinen bei einer Verdünnung von 1:4 bis 1: 6.

Zur Isolierung von Kernextrakten wurden die Zellen auf 200 cm² großen quadratischen Petrischalen gezüchtet. Dazu wurden die annähernd konfluent gewachsenen Zellen aus ein- bis eineinhalb Kulturflaschen nach der Trypsinisierung unverdünnt mit 100 ml Dulbecco's Medium / 5% Serum pro Petrischale inkubiert.

3.2. Präparation von Kernextrakten aus 3T3 - Zellen

(Challberg und Kelly, 1979, modifiziert von Schneider, pers. Mitteilung)

Die wie unter 3.1.1. beschrieben gezüchteten Zellen wurden bei einer Zelldichte von 9×10^7 pro Platte nach Absaugen des Mediums gründlich mit Pbs-d gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Gummischaber (rubber-policeman) vorsichtig von der Plastikoberfläche abgeschabt und pro Platte mit 5ml kaltem Hypo-Hepes-Puffer I aufgenommen. Durch Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert (15 Min., 4°C, 1400 rpm), das Sediment zweimal mit dem selben Puffer suspendiert und durch erneute Zentrifugation (5 Min., 4°C, 3000 rpm) geerntet. Das Zellsediment wurde dann mit 1/5 des Ausgangsvolumens in Hypo-Hepes-Puffer II aufgenommen und bei 0°C inkubiert. Die gequollenen

Zellen wurden durch ca. 20 Kolbenbewegungen eines Dounce-Homogenisators lysiert. Die Effizienz der Lyse konnte im Phasenkontrastmikroskop verfolgt werden. Das Zellysate wurde dann in ein kalibriertes Zentrifugenröhrchen überführt und die Kerne durch Zentrifugation geerntet (5-10 Min., 4°C, 3000 rpm in der Tischzentrifuge). Der milchig - trübe cytoplasmatische Überstand wurde vorsichtig abpipetiert und die Kerne durch wiederholtes Suspendieren und Zentrifugieren in 2 Volumen Waschpuffer von Cytoplasmaresten befreit.

Das Kernpellet wurde in einem Volumen Lysispuffer suspendiert und 30 Minuten bei 0°C unter gelegentlichem leichtem Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation (20 Min., 20000 rpm, 4°C im SS 34 - Rotor, Sorvallzentrifuge) erhielt man einen löslichen Kernextrakt, der dann durch Dialyse auf die geeignete Salzkonzentration gebracht wurde und in Aliquots bei - 80°C eingefroren wurde.

Hypo - Hepes - Puffer I:	20 mM Hepes pH 7.5
	5 mM KCl
	0.5 mM MgCl ₂
	0.5 mM DTT
	0.2 M Sucrose
Hypo - Hepes - Puffer II:	wie Puffer I, ohne Sucrose
Waschpuffer für Kerne:	25 mM Tris - HCl pH 7.5
	10 % Sucrose
Lysispuffer:	25 mM Tris - HCl pH 7.5
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	10 % Sucrose
	0.35 M NaCl
Dialysepuffer:	25 mM Tris - HCl pH 7.5
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	10 % Glycerin
	0.15 M NaCl

3.3. Präparation von Mäuseorganen

Weißer Labormäuse wurden kurz mit Äther betäubt, durch Genickbruch getötet und Leber, Milz und Hirn präpariert. Die intakten Organe wurden entweder unmittelbar zur Herstellung von Kernextrakten verwendet oder bei - 80°C aufbewahrt.

3.4. Herstellung von Kernextrakten aus Organen der Maus

Die Aufarbeitung der Gewebe erfolgte für alle verwendeten Gewebe nach dem gleichen Schema und wird im folgenden nur für Leber beschrieben. (Schneider, pers. Mitteilung). Alle Schritte wurden bei 4°C ausgeführt.

Das aufgetaute Gewebe wurde zunächst durch eine sterile Knoblauchpresse gedrückt um das Bindegewebe zu zerkleinern. Die Gewebstrümmer wurden mit 3ml Puffer I / g Leber zwei - bis dreimal in einem Dounce - Homogenisator weiter zerkleinert und dann durch die Kanüle einer 10ml - Spritze gedrückt. Dadurch wurden die Zellen weitgehend lysiert. Alle Schritte wurden im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Durch Zentrifugation (10 Min., 4°C, 2500 rpm im SS 34 - Rotor) erhält man ein lockeres Kernpellet, das aber noch von Gewebeteilen und Erythrocyten verunreinigt ist. Das Pellet wurde in Puffer II suspendiert und durch Zentrifugation durch ein 0,34 M Sucrosekissen (Puffer III) weiter gereinigt. (15 Min., 4°C, 4000 rpm im SS 34 - Rotor).

Der Überstand wurde verworfen, das Kernsediment mit dem 4 - 5 - fachen Volumen in einem 2.4 M Sucrosepuffer (Puffer IV) aufgenommen und eine Stunde bei 20000 rpm bei 4°C im SS 34 Rotor zentrifugiert. Man erhält ein kleines, aber noch nicht ganz sauberes Kernpellet. Deshalb wurde dieser Zentrifugationsschritt wiederholt. Die Zellkerne wurden dreimal durch Suspendieren in 2 - 3 Volumen Waschpuffer und anschließende Zentrifugation (5 Min., 4°C, 3000 rpm) gewaschen. Die Lyse der Kerne erfolgte 30 - 60 Minuten in einem Eisbad im Kühlraum mit 2 Volumen Lysispuffer unter gelegentlichem leichtem Schütteln. Durch Zentrifugation des Kernlysats (20 Min., 4°C, 20000 rpm) wurde der lösliche Kernextrakt von unlöslichem Kernmaterial befreit.

Dieser Extrakt wurde über Nacht dialysiert und anschließend in Aliquots bei - 80°C eingefroren.

Puffer I:	0.33 M Sucrose 25 mM Hepes - KOH pH 7.5 4 mM CaCl ₂
Puffer II:	0.25 M Sucrose 25 mM Hepes - KOH pH 7.5 3 mM CaCl ₂
Puffer III:	0.34 M Sucrose 25 mM Hepes - KOH pH 7.5 3 mM CaCl ₂
Puffer IV:	2.4 M Sucrose 25 mM Hepes - KOH pH 7.5 3 mM CaCl ₂
Waschpuffer:	0.24 M Sucrose 25 mM Hepes - KOH pH 7.5 3 mM CaCl ₂
Lysispuffer:	25 mM Hepes - KOH pH 7.5 1 mM DTT 3 mM CaCl ₂ 200 mM NaCl 0.24 M Sucrose
Dialysepuffer:	25 mM Hepes - KOH pH 7.5 1 mM EDTA 1 mM DTT 150 mM NaCl 10 % Glycerin

3.5. Nachweis von Proteinen

3.5.1. Proteinbestimmung mit Biorad Protein Assay Kit

Zur möglichst genauen Bestimmung des Proteingehalts in den Kernextrakten wurde der Kit der Firma Biorad verwendet. Damit können Analysen im Bereich von 0.2 - 1.4 mg / ml (Standardmethode), bzw. 1 - 25 µg / ml (Mikromethode) durchgeführt werden. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford (1976), daß das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie

Brilliant Blue nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm nach 595 nm verschoben wird.

Für den Mikrotest wurde eine Eichkurve mit 2 - 20 µg Rinderserumalbumin pro Ansatz erstellt. Dazu wurde das entsprechend verdünnte Protein in einem Volumen von 0.8 ml mit 0.2 ml Farbstofflösung (Coomassie Brilliant Blue, Phosphorsäure, Methanol) in Einwegküvetten gemischt. Nach 5 - 60 Minuten wurde die Extinktion gegenüber dem Leerwert (0.8 ml Puffer; 0.2 ml Farbstofflösung) bestimmt. Der Proteingehalt der zu messenden Probe (Doppelbestimmungen, verschiedene Verdünnungen) konnte so einfach aus der Eichkurve ermittelt werden.

3.5.2. Auftrennung von Proteinen in SDS - Harnstoff - Polyacrylamidgelen

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aus Kernrohextrakten wurden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet.

4 - 5 µg Proteinlösung wurden bis fast zur Trockene eingedampft, mit 20 µl Probenpuffer aufgenommen und auf ein 5 - 15 % iges Polyacrylamid - Gradientengel aufgetragen. Das Gel war zuvor zur Entfernung des Ammoniumperoxodisulfats 30 Minuten bei 80 Volt vorelektrophoretisiert worden. Ein Aufkochen der Proben war wegen Zusatz von 8 M Harnstoff im Probenpuffer nicht erforderlich. Die Elektrophorese wurde für 5 - 6 Stunden bei 100 Volt durchgeführt.

Herstellung eines 5 - 15 % igen SDS - Harnstoff - Polyacrylamidgels:

	<u>5 %</u>	<u>15 %</u>
A / Bis	0.9 ml	2.7 ml
(44 / 0.8 %)		
1.5 M Tris pH 8.8	2 ml	2 ml
(1M)		
SDS (10 %)	150 µl	150 µl
Harnstoff	1.9 g	1.9 g
APS (30 %)	125 µl	125 µl
H ₂ O	ad 7.5 ml	ad 7.5 ml

Die vorbereiteten Gellösungen wurden in ein Gradientenmischgerät gefüllt, die Polymerisation durch Zugabe von je 10 µl TEMED gestartet, und das 0.75 mm dicke Gel unter Anlegen des Gradienten (unten 15 %, oben 5 %) gegossen.

Probenpuffer: 1% SDS
8% β - Mercaptoethanol
8 M Harnstoff
in 5 mM Tris pH 6.8

Elektrophoresepuffer: 0.05 M Tris
0.4 M Glycerin
0.1 % SDS

3.5.3. Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen

3.5.3.1. Coomassie - Blau - Färbung

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel 20 Minuten in 20 % iger Trichloressigsäure fixiert und dann 30 Sekunden mit Entfärbelösung gewaschen. Anschließend wurde das Gel 30 Minuten mit Färbelösung angefärbt. Das Gel wurde unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung so lange entfärbt, bis der blaue Hintergrund verschwunden war.

Färbelösung: 0.5 g Coomassie - Brilliant - Blue in 250 ml Methanol lösen, 1:1 mit 20 % igem Eisessig mischen und filtrieren

Entfärbelösung: 70 % Methanol
20 % Eisessig

3.5.3.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde im wesentlichen nach dem Protokoll von Heukeshoven und Dernick (1983) durchgeführt. Die besten Ergebnisse erzielte man, wenn die Gele mit Coomassie vorgefärbt waren.

Alle Schritte wurden unter leichtem Schütteln ausgeführt.

Das mit Coomassie - gefärbte und entfärbte Gel wurde zuerst zweimal 5 Minuten mit 10 % igem Ethanol, dann dreimal 3 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Sodann wurde 30 Minuten in frisch hergestellter 0.1 % iger Silbernitratlösung angefärbt. Nach kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser wurde das Gel solange ($\approx$ 10 Minuten) in Entwicklerlösung geschüttelt, bis die Proteinbanden stark angefärbt waren. Ein dunkler Hintergrund war dabei nicht störend, da er beim sog. Recycling - Schritt wieder verschwand. Die Reaktion wurde durch Einlegen des Gels in 1% ige Essigsäure gestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für je 3 Minuten wurde das Gel

nm wurde Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 150 µg / ml zugegeben. Dadurch wurden die Bakterien zu vermehrter Plasmidproduktion angeregt. Die Kultur wurde über Nacht weitergeschüttelt und die Bakterien am nächsten Tag durch Zentrifugation geerntet.

3.6.3. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Transformationskompetente DH1 - Bakterien wurden nach dem Protokoll von Hanahan (1983) hergestellt.

5 ml antibiotikafreies, vorgewärmtes Medium wurde mit einer Einzelkolonie des Stammes DH 1 angeimpft, bis zu einer OD₅₅₀ von 0.3 herangezogen, auf 100 ml mit DH1 - Medium verdünnt und bis zu einer OD₅₅₀ von 0.48 bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde 5 Minuten auf Eis abgekühlt und dann 5 Minuten bei 4°C und 6000 rpm abzentrifugiert.

Das Zellsediment wurde in 2 / 5 Volumen kaltem Tfb I suspendiert und für 5 Minuten auf Eis stehengelassen. Anschließend wurde 5 Minuten bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1 / 25 Volumen (4ml) Tfb II aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde dann in 200 µl - Fraktionen in vorgekühlte Eppendorfgefäße abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei - 80°C aufbewahrt.

Tfb I:	30 mM Kac 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15 % Glycerin mit 0.2 M Essigsäure auf pH 5.8 einstellen, steril filtrieren
--------	---

Tfb II:	10 mM Pipes 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15 % Glycerin mit KOH auf pH 6.5 einstellen, steril filtrieren
---------	--

Für die Transformation mit pUC - Plasmiden wurde meist der Bakterienstamm JM 83 verwendet. Dazu wurden 100 ml LB - Medium (10 g Trypton, 5 g

Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1 l H₂O_{bidest}) mit 1 ml einer Übernachtskultur JM 83 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 - 0.6 bei 37°C herangezogen. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert, das Sediment in 20 ml eiskaltem Kalziumpuffer (1mM Tris - HCl pH 7.8 ; 50 mM CaCl₂) suspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann 10 Minuten bei 3000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 4 ml Kalziumpuffer mit 15 % Glycerin aufgenommen und in 200 µl - Fraktionen bei - 80°C eingefroren (Cohen et al., 1972)

3.6.4. Transformation von Bakterien

200 µl transformationskompetente Bakterien wurden bei 0°C aufgetaut und mit 50 ng bis 1µg ligierter DNA für 30 - 60 Minuten bei 0°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C. Nach Zugabe von 0.8 ml DH 1 -, bzw. LB - Medium (37°C) wurde der Ansatz eine Stunde bei 37 ° C inkubiert. Je nach der zu erwartenden Anzahl von Klonen wurden 1 - 10 % dieses Ansatzes auf eine vorgewärmte Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.6.5. Aufbewahren von Bakterienstämmen

Auf Agarplatten, die zum Schutz vor Austrocknung und Infektion mit Parafilm umwickelt worden waren, konnten Bakterienstämme bis zu einigen Monaten bei 4°C aufbewahrt werden. Für längere Lagerung wurden 1 ml Übernachtskulturen mit 20 % Glycerin versetzt und bei - 80°C eingefroren.

3.7. Klonieren von DNA in Plasmide

Als Vektoren wurden meist *E.coli* - Plasmide der pUC - Reihe verwendet (Vieira und Messing, 1982). Dazu wurde der Vektor in der Polylinkerregion mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten (s. 3.9.2.). Über Gelelektrophorese wurde der nicht - essentielle Teil des Plasmids abgetrennt und das Vektorfragment aus dem Gel isoliert (s. 3.10.2.). Obwohl Vektorrelierung über zwei inkompatible Schnittstellen ausgeschlossen sein sollte, wurde in den meisten Fällen trotzdem dephosphoriert (s. 3.9.3.). Analog wurde das zu klonierende DNA - Fragment aus dem Gel gewonnen und über eine

Ligasereaktion mit der Vektor - DNA verknüpft (s. 3.9.6). Bei pUC - Plasmiden wurde die Klonierungsstelle nach Möglichkeit so gewählt, daß durch die Insertion "fremder" DNA ein ursprünglich auf dem Plasmid vorhandener "Marker" - z.B. das Gen für β - Galactosidase - zerstört wurde. Durch Zugabe des Indikators X - Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid), das durch Einwirkung von β - Galactosidase in das entsprechende Indoxylderivat überführt und an der Luft zu einem blauen Farbstoff oxidiert wird, wird das Auffinden rekombinanter Kolonien erleichtert. Bakterienkolonien, in denen β - Galactosidase produziert wird, sind an ihrer blauen Farbe zu erkennen, während rekombinante Klone weiße Kolonien erzeugen.

3.8. Identifizierung rekombinanter Plasmide

3.8.1. Schnellmethoden zur Isolierung und Charakterisierung von Plasmiden

a) Schnellaufschluß nach Holmes (1981)

Die Bakterien einer 5 ml Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, in 0.4 ml STET - Puffer suspendiert und mit 30 μ l Lysozym (10 mg / ml) versetzt. Nach Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur wurden die Ansätze eine Minute bei 100° C im Wasserbad gekocht und dann sofort auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge (15 Min., 4°C, 15000 rpm). Der Überstand wurde mit einem Volumen kaltem Isopropanol versetzt und 30 Minuten bei - 20°C gefällt. Die DNA wurde 15 Minuten in der Eppendorffzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit 70 % igem Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das DNA - Pellet wurde in 100 μ l TE - Puffer mit 20 μ g / ml RNase A gelöst. Wollte man möglichst saubere DNA - Präparationen erhalten, wurde die DNA vor der Isopropanol - fällung zweimal mit Phenol extrahiert (s. 3.9.1.).

STET - Puffer:

8 % Sucrose
5 % Triton X 100
50 mM EDTA
50 mM Tris - HCl pH 8

TE - Puffer

10 mM Tris - HCl pH 7.4
1 mM EDTA

b) Alkalischer Schnellaufschluß (Maniatis, 1982)

1.5 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und eine Minute abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl eiskaltem GET - Puffer mit Lysozym aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl einer eiskalten, frisch hergestellten 0.2 M NaOH -, 1 % SDS - Lösung zugegeben, gemischt und 5 Minuten bei 0°C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit 150 µl eiskalter 3 M Kaliumacetat - Lösung pH 4.8 neutralisiert, schnell mit dem Vortex gemischt und 5 Minuten bei 0°C gehalten. Das Lysat wurde 5 Minuten bei 4° C in der Eppendorfsentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Daran schloß sich eine Extraktion mit einem Volumen Phenol / Chlo - roform an. Die DNA wurde mit zwei Volumen Ethanol bei Raumtemperatur gefällt. Der DNA - Niederschlag wurde mit 1ml Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE - Puffer mit 20 µg / ml RNase A gelöst.

GET - Puffer:	50 mM Glucose
	10 mM EDTA
	20 mM Tris - HCl pH 8
	4 mg / ml Lysozym (vor Gebrauch zugeben)

3.8.2. Isolierung von Plasmid - DNA durch Dichtegradientenzentrifugation

500 ml DH - 1 Medium mit Antibiotikum wurden mit 2 ml Übernachtskultur des Plasmid - enthaltenden Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.8 wurde die Plasmidvermehrung durch Zusatz von 75 mg Chloramphenicol (Endkonzentration 150 µg / ml) stimuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37°C weiter inkubiert. Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation geerntet (10 Min., 4° C, 6000 rpm). Das Sediment wurde mit 3 ml kalter 25 % iger Sucrose - Lösung suspendiert und die Bakterien dann durch Zugabe von 0.5 ml Lysozymlösung (5 mg / ml in 0.25 M Tris - HCl pH 8) und 1 ml 0.2 M EDTA 5 Minuten auf Eis lysiert. Nach Zusatz von 4 ml Triton-Lysis-Mix wurde weiterlysiert bis der Ansatz viskos wurde (5 - 10 Min.) und dann im SS 34 - Rotor zentrifugiert (20 Min., 4°C, 20000 rpm). 3.5 ml des die Plasmid - DNA enthaltenden Überstands, das sogenannte "cleared lysate", wurden mit 3.325 g Cäsiumchlorid in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 175 µl Ethidiumbromid (20 mg / ml) gemischt. Die Zentrifugation erfolgte in einem

Vertikalrotor des Typs TV 865 mit 47000 rpm bei 18°C für 20 Stunden in einer Sorvall Ultrazentrifuge. Nach der Zentrifugation konnte unter langwelligem UV- Licht (366 nm) die Plasmid - DNA als Bande in der Mitte des Röhrchens sichtbar gemacht werden. Durch Anstechen des Röhrchens mit einer Spritze wurde die Plasmidbande abgezogen und nach Zugabe des entsprechenden Volumens TE - Puffer mit Cäsiumchlorid (19 g CsCl in 20 ml TE - Puffer) erneut zentrifugiert (4.5 h, 18° C, 56000 rpm). Diese zweimalige Dichte - gradientenzentrifugation hatte den Zweck, eine möglichst saubere DNA-Präparation zu erzielen. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt ist die DNA noch mit relativ viel RNA verunreinigt, die im unteren Teil des Röhrchens sedimentiert.

Das Ethidiumbromid wurde dreimal mit Isopropanol, das mit einer CsCl - TE - Lösung gesättigt war, extrahiert. Die nunmehr farblose DNA - Lösung wurde dann zweimal gegen TE - Puffer dialysiert.

Die Konzentration der DNA wurde durch Messen der Extinktion bei 260 nm bestimmt, wobei eine $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg / ml DNA entspricht.

Sucrose - Puffer:	25 % Sucrose in 50 mM Tris - HCl pH 8
Triton - Lysis - Mix:	50 mM Tris - HCl pH 8
	60 mM EDTA
	0.2 % Triton X 100

3.8.3. Koloniehybridisierung

Will man eine große Anzahl von Klonen schnell auf den Einbau von rekombinanter DNA überprüfen, kann man die Technik der Kolonie - hybridisierung anwenden (Grunstein und Hogness, 1975).

Dazu wurden die zu prüfenden Klone auf Agarplatten mit einem Raster überimpft und angezogen. Auf die Platten wurde ein rundes Nitrozellulosefilter aufgelegt, das, nachdem es vollständig benetzt war, abgezogen wurde und nun ein genaues Abbild der auf der Platte vorhandenen Kolonien enthielt. Das Filter wurde dann mit den Kolonien nach oben drei Minuten auf ein mit 10 % igem SDS getränktes Filterpapier gelegt. Auf die gleiche Weise erfolgte ein fünf - bis zehn - minütiger Denaturierungsschritt in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl. Danach wurde zweimal fünf Minuten in 0.5 M Tris - HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl neutralisiert. Nach fünf - minütiger Behandlung mit 2 x SSC wurde im

allgemeinen eine Proteinase K - Behandlung angeschlossen. Dazu wurde das Filter in einer Petrischale, die eine Lösung von 20 µg / ml Proteinase K enthielt, 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Filter 30 Minuten an der Luft getrocknet und zwei Stunden bei 80°C gebacken.

Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten wie unter 3.10.5. beschrieben.

3.9. Enzymatische Reaktionen an freier DNA

3.9.1. Reinigung und Konzentrierung von DNA

Um eine DNA - Präparation zu erhalten, die frei von Nukleasen war, wurde die DNA - Lösung mit einem Volumen an TE - gesättigtem Phenol versetzt, die Phasen durchmischt und dann durch Zentrifugation voneinander getrennt. Die obere wässrige Phase wurde dann in ein neues Gefäß überführt und eine zweite Extraktion, diesmal mit einem Volumen eines 1:1 - Gemisches aus TE - gesättigtem Phenol und Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Um Phenolreste zu entfernen wurde die wässrige Phase noch einmal mit Chloroform / Isoamylalkohol extrahiert.

Zur wässrigen Phase wurden 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.5 und 2.5 Volumen absoluter Ethanol gegeben. Diese Lösung wurde durchmischt und entweder über Nacht bei - 20°C oder mindestens eine Stunde bei - 80°C zur Fällung der DNA aufbewahrt. Die DNA wurde dann durch Zentrifugation (15 Min., 4°C, 15000 rpm) präzipitiert. Der DNA - Niederschlag wurde mit 70 % igem Ethanol gewaschen und dann kurz im Vakuum getrocknet.

Das DNA - Pellet wurde im gewünschten Volumen des für die nachfolgenden Reaktionen geeigneten Puffers gelöst.

3.9.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde die gewünschte Menge an DNA mit dem entsprechenden 5x Puffer auf die benötigten Salzbedingungen eingestellt. Die Spaltung wurde mit ein bis mehreren Enzymeinheiten bei der angegebenen Temperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von 1 / 10 Volumen EDTA gestoppt oder direkt mit Auftragspuffer versetzt und der Elektrophorese unterworfen.

Auftragspuffer:	10 mM Tris - HCl pH 8
	50 mM EDTA
	1 % SDS
	0.1 mg / ml Bromphenolblau
	25 µg / ml Xylencyanol
	30 % Glycerin

Versuchsbedingungen für Restriktionsspaltungen:

<u>Enzym</u>	<u>Konzentration im Ansatz</u>	<u>Temperatur</u>
Eco R I	100 mM Tris - HCl pH 7.4 50 mM NaCl 6 mM MgCl ₂ 0.05 % Triton X 100	37°C
Pst I, Hind III, Sph I, Pvu II, Hpa I, Bgl I	6 mM Tris - HCl pH 7.4 50 mM NaCl 6 mM MgCl ₂ 6 mM MeEtOH 0.05 % Triton X 100	37°C
Bam H I, Xho I, Sal I	6 mM Tris - HCl pH 8 150 mM NaCl 6 mM MgCl ₂ 6 mM MeEtOH 0.05 % Triton X 100	37°C
Sma I	6 mM Tris - HCl pH 8 20 mM KCl 6 mM MgCl ₂ 6 mM MeEtOH	30°C

Die Puffer wurden 5 - fach konzentriert angesetzt.

3.9.3. Abspalten von 5' - Phosphatresten durch alkalische Phosphatase

Bei der Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen entstehen Fragmente, die am 5' - Ende einen Phosphatrest tragen. Um zu verhindern, daß die linearisierte DNA während der Ligasereaktion rezirkularisiert oder um die 5' - Enden der Markierung mit T4 - Kinase zugänglich zu machen, ist es erforderlich, den 5' - Phosphatrest zu entfernen.

Dazu wurde die DNA nach der Spaltung mit 1/20 Volumen 20 x RAP - Puffer auf die geeigneten Salzbedingungen eingestellt und die Reaktion mit 1-5 Enzymeinheiten alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Das Enzym wurde anschließend durch Phenolextraktion entfernt und die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2.5 Volumen Ethanol gefällt.

20 x RAP - Puffer:	800 mM Tris - HCl pH 8
	100 mM MgCl ₂
	10 mM ZnCl ₂

3.8.4. Phosphorylierung von DNA - Fragmenten mit T4 - Polynukleotidkinase

Für die Markierung von DNA - Fragmenten oder Oligonukleotiden mit hervorstehenden 5' - Enden wurden zwischen 1 und 20 pMol Enden mit 2 µl zehnfach konzentriertem Kinasepuffer sowie 2 µl T4 - Polynukleotidkinase (≈ 10 U) gemischt und der Ansatz mit bidestilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde in ein neues Reaktionsgefäß, das 50 - 100 µCi lyophilisiertes [γ -³²P] - ATP (3000 Ci/mmol) enthielt, übertragen und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Ansatz mit TE - Puffer auf 100 µl aufgefüllt.

Die Bestimmung der Menge der in die DNA eingebauten Radioaktivität erfolgte durch Fällung eines Aliquots der markierten Probe mit 10 % iger TCA. Dazu wurde die markierte DNA mit 10 µl Kalbsthymus - DNA (10 mg / ml) versetzt und 15 Minuten mit 10 % iger TCA auf Eis gestellt. Die markierte DNA wurde dann in einer Absaugapparatur an ein GF / C - Filter gebunden und mehrmals mit TCA nachgewaschen. Nach dem Trocknen des Filters konnte die Menge der zurückgehaltenen Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt werden.

DNA - Fragmente mit glatten oder zurückgezogenen Enden sind weniger geeignete Substrate für die T4 - Kinase. Durch vorangehende partielle Denaturierung ist eine 5'-Markierung jedoch auch bei solchen Fragmenten möglich.

Die DNA wurde vor der Reaktion mit Ethanol gefällt und im Vakuum getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 40 µl Blunt - end - Puffer I gelöst, zwei Minuten auf 90°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl 5 x Puffer II, 50 - 100 µCi [γ - ^{32}P] - ATP und 2 µl T4 - Kinase wurde bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit TE - Puffer auf 100 µl aufgefüllt.

Die Abtrennung nicht - eingebauten ATPs erfolgte bei DNA - Fragmenten über das Molekularsieb Sephadex G 50. Die markierten Fragmente wurden mit TE - Puffer von der Säule eluiert und Aliquots der eluierten Fraktionen einer TCA - Fällung unterzogen. Die Gesamtaktivität war zu 50 - 80 % TCA - fällbar.

Bei der Phosphorylierung von Oligonukleotiden erfolgte die Abtrennung des überschüssigen ATPs durch Ionenaustauschchromatographie. Dazu wurde der Ansatz auf eine mit DE 52 gefüllte Säule aufgetragen und mehrmals mit 0.2 M NaCl in TE - Puffer gewaschen. Unter diesen Bedingungen wurde nur das ATP eluiert, während das Oligonukleotid am Austauscher gebunden blieb. Mit 0.5 M NaCl in TE wurde anschließend das Oligonukleotid abgelöst. Die Elution erfolgte mittels Zentrifugation durch eine 0.5 ml Säule, die in einer 1 ml Spritze gepackt worden war.

10 x Kinase - Puffer:

0.5 M Tris - HCl pH 7.6
0.1 M MgCl_2
50 mM DTT
1 mM Spermidin
1 mM EDTA

Blunt - end - Puffer I:

20 mM Tris - HCl pH 9.5
1 mM Spermidin
0.1 mM EDTA

5 x Puffer II:

250 mM Tris - HCl pH 9.5
50 mM MgCl_2
25 mM DTT
25 % Glycerin

3.9.5. Markierung von DNA durch Nick - Translation

Für die Hybridisierung an Southern - Blots wurden DNA - Fragmente durch Nick - Translation radioaktiv markiert. In einem Gesamtvolumen von 10 - 20 μ l wurden ca. 1 μ g DNA mit 1 / 10 Volumen 10 x Nick - Translations - Puffer gemischt. Um die erforderlichen Einzelstrangbrüche zu setzen, wurde 1 μ l einer verdünnten DNase - Lösung (100 ng/ml) zugesetzt, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und der Ansatz dann in ein Reaktionsgefäß überführt, das 30 μ Ci [α - 32 P] d CTP und 5 Einheiten DNA - Polymerase I enthielt. Das Reaktionsvolumen wurde mit bidestilliertem Wasser ergänzt. Es folgte eine Inkubation von 90 - 120 Minuten bei 15°C. Die Abtrennung der nicht - eingebauten Nukleotide erfolgte wie unter 3.9.4. beschrieben über eine Sephadex G 50 - Säule.

10 x Nicktranslationspuffer:	70 mM Tris - HCl pH 7.4
	10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	20 μ M dATP
	20 μ M dGTP
	20 μ M dTTP

3.9.6. Verknüpfung von DNA - Fragmenten durch T4 - Ligase

Für die Klonierung von DNA - Fragmenten in Bakterien, mußte die "fremde" DNA mit der Vektor - DNA durch eine Ligase - Reaktion verknüpft werden. Die Reaktion wurde üblicherweise in einem Volumen von 10 - 20 μ l durchgeführt, dabei wurden die geeigneten Salzbedingungen durch Zugabe eines zehnfach konzentrierten Ligasepuffers eingestellt. Im allgemeinen wurden 0.2 - 1 μ g Vektor - DNA eingesetzt, die "fremde" DNA wurde in äquimolaren Mengen oder in leichtem Überschuß zugegeben (Dugaiczik et al., 1975). Die Reaktion erfolgte mit 5 - 10 Einheiten T4 - Ligase über Nacht bei 15°C.

10 x Ligase - Puffer:	0.5 M Tris - HCl pH 7.4
	100 mM MgCl ₂
	10 mM Spermidin
	250 mM DTT
	10 mM ATP

3.10. Charakterisierung von DNA

3.10.1. Auftrennung von DNA auf Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA - Fragmenten für analytische oder präparative Zwecke erfolgte auf 0.8 - bis 1.5 % igen Agarosegelen. Die Agarose wurde in Tris - Acetat - Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht, auf 70°C abgekühlt, mit 0,5 µg / ml Ethidiumbromid versetzt und entweder in eine Horizontalgel - Apparatur oder - für Vertikalelektrophorese - zwischen zwei vorbereitete Glasplatten gegossen. Durch das Einführen eines Kammes entstanden je nach Art des Kammes 5, 10 oder 20 Taschen zum Auftragen der Proben. Der Kamm wurde nach dem Festwerden der Agarose entfernt. Die DNA - Proben wurden mit 1 / 5 - 1 / 2 Volumen Auftragspuffer (s. 3.9.2.) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x Tris - Acetat - Puffer bei 30 - 40 mA durchgeführt. Die DNA wurde nach Beendigung der Elektrophorese durch Bestrahlen des Gels mit UV - Licht (254 nm) als rot fluoreszierende Bande sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera auf Polaroidfilm (Typ 107) fotografiert.

Für die schnelle Analyse von DNA über den Erfolg von vorangegangenen Manipulationen, wie z.B. Restriktionsverdauungen, haben sich besonders die sogenannten "Minigele" mit einer Fläche von 50 x 75 mm bewährt (BRL, Modell H6, Babygel). Diese Gele benötigen wenig Material, sind sehr empfindlich und die Elektrophorese ist innerhalb von 30 - 45 Minuten beendet.

1x Tris - Acetat - Puffer:	40 mM Tris - Acetat pH 7.8 5 mM NaAc 1 mM EDTA
----------------------------	--

Agarose - Lösung:	0.8 - 1.5 g Agarose ad 100 ml 1x Tris - Acetat - Puffer
-------------------	---

3.10.2. Isolierung und Reinigung von DNA - Fragmenten aus Agarosegelen (Wieslander, 1979)

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde niedrig - schmelzende Agarose verwendet, die erst bei Temperaturen unter 37°C geliert und bei 65°C schmilzt. Da diese Gele sehr labil sind, wurden im allgemeinen 1.5 % ige

Agarosegele hergestellt, auf denen sich zusätzlich zur höheren Stabilität kleine DNA - Fragmente besser voneinander trennen lassen.

Das mit Ethidiumbromid angefärbte DNA - Fragment wurde unter langwelligem UV - Licht aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstückchen bei 65°C geschmolzen. Die flüssige Agarose wurde mit Phenol extrahiert wie unter 3.9.1. beschrieben. Jeweils vor den Zentrifugationsschritten wurde das Reaktionsgefäß für fünf Minuten auf Eis gestellt, was eine bessere Trennung von Agarose und wässriger Phase zur Folge hatte. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt. Die Ausbeute lag in der Regel bei 70 - 80% und die so erhaltenen DNA - Fragmente konnten erfolgreich für weitere enzymatische Reaktionen eingesetzt werden.

Agarose - Lösung:	1%, bzw. 1.5% Low Gelling Temperature Agarose in 1x Tris - Acetat - Puffer
-------------------	--

weitere Reagentien wie unter 3.10.1.

3.10.3. Reinigung synthetischer Oligonukleotide über Polyacrylamid - Harnstoffgele

Um synthetische Oligonukleotide nach der Synthese von den kürzeren Abbruch - produkten zu trennen, wurde das Oligonukleotidgemisch einer Elektrophorese in denaturierenden Polyacrylamidgelen unterworfen.

Für ein 15 % iges Polyacrylamid - 8 M Harnstoffgel wurden 56 ml Polyacrylamid (Stammlösung 40 % ; Verhältnis Acrylamid / Bisacrylamid = 38:2), 15 ml 10 x TEB und 75 g Harnstoff auf 150 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt, 150 µl 30 % iges Ammoniumperoxodisulfat zugegeben und die Polymerisation mit 150 µl TEMED gestartet. Nach der Vorelektrophorese wurden etwa 20 % des Syntheseansatzes (20 µl) mit 10 µl Formamid und 5 µl Farbmarker gemischt, kurz auf 65°C erwärmt und dann in die Geltaschen pipetiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Leistung von 20 Watt durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das Plattenende erreicht hatte.

Die Identifizierung der Banden erfolgte über UV - Fluoreszenzlöschung (engl: UV - Shadowing). Dazu wurde das Gel auf Haushaltsfolie transferiert und auf eine Dünnschicht - Chromatographieplatte gelegt, die mit einem bei 254 nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet war. Unter UV - Auflicht wurden die Oligonukleotide als dunkle Banden sichtbar. Das gewünschte

Produkt - im allgemeinen die oberste gut sichtbare Bande - wurde mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstückchen wurde in eine zugeschmolzene und mit Glaswolle verstopfte 1 ml - Pipettenspitze überführt und mit einem Glasstab zu einer Paste zerrieben. Zur Elution der DNA wurde die Gelpaste mit 400 µl bidestilliertem Wasser mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die zugeschmolzene Spitze wurde abgeschnitten und die Lösung durch die Glaswolle zentrifugiert. Das Eluat wurde auf 0.3 M Natriumacetat und 10 mM Magnesiumchlorid eingestellt, 2.5 Volumen absoluter Ethanol zugegeben und über Nacht bei - 80°C aufbewahrt. Anschließend wurde die DNA für 30 Minuten bei 0°C mit 20000 rpm im SS 34 - Rotor abzentrifugiert. Das DNA - Pellet wurde in 100 µl 0.3 M Natriumacetat gelöst und ein zweites Mal über Nacht gefällt. Der erhaltene DNA - Niederschlag wurde in TE - Puffer gelöst und die Konzentration durch Messen der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Für die Berechnung wurde für jedes Nukleotid der entsprechende Extinktionskoeffizient eingesetzt.

$$\Sigma_{260} (A) = 15$$

$$\Sigma_{260} (C) = 7.4$$

$$\Sigma_{260} (G) = 11.8$$

$$\Sigma_{260} (T) = 8.8$$

Die Summe entspricht dem Gehalt an DNA in µmol / ml.

Die gereinigten komplementären Einzelstränge wurden im gleichen Verhältnis gemischt und durch mehrstündige Inkubation bei Raumtemperatur zum Doppelstrang vereinigt.

10 x Farbmaler:	80 % Formamid
	50 mM EDTA
	0.25 % Bromphenolblau
	0.25 % Xylencyanol

3.10.4. Übertragung von DNA von Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter

Zur Hybridisierung von DNA - Fragmenten mit radioaktiv markierter DNA wurden die Fragmente nach der elektrophoretischen Auftrennung in Agarosegelen auf Nitrozellulose übertragen. (Southern, 1975; 1980)

Da nur einzelsträngige DNA an Nitrozellulose bindet, wurde das Gel zunächst 10 Minuten denaturiert. Zur Neutralisation wurde das Gel dann zweimal 10

Minuten in Neutralisierungslösung gebadet. Anschließend wurde es auf ein mit 20 x SSC getränktes Filterpapier gelegt und ein in der Größe zurecht - geschnittenes, angefeuchtetes Nitrozellulosefilter luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht. Als Saugpapier dienten mehrere Lagen von Papierhandtüchern. Nach dem Transfer, der über Nacht durchgeführt wurde, wurde das Filter luftgetrocknet und dann zwei Stunden bei 80°C eingebacken.

Denaturierungslösung:	1.5 M NaCl 0.5 M NaOH
Neutralisierungslösung:	1.5 M NaCl 0.5 M Tris - HCl pH 8
20 x SSC	3 M NaCl 0.3 M Na - citrat

3.10.5. DNA / DNA - Hybridisierung nach Southern

Das Nitrozellulosefilter mit der gebundenen einzelsträngigen DNA wurde mit Wasser angefeuchtet und in einer Plastiktüte zusammen mit Prähybridisierungsmix eingeschweißt. Die Prähybridisierung, die zur Absättigung unspezifischer Bindestellen auf dem Nitrozellulosefilter diente, wurde mindestens vier Stunden, besser aber über Nacht, in einem Schüttelwasserbad bei 42°C durchgeführt. Danach wurde der Prämix gegen hitzedenaturierten Hybridisierungsmix ausgewechselt und wieder über Nacht bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde das Filter dreimal 15 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC, 0.1 % SDS und zweimal 15 Minuten bei 55° C in 0.1 x SSC, 0.1 % SDS gewaschen. Das Filter wurde luftgetrocknet und durch Autoradiographie ausgewertet.

Prähybridisierungsmix:	50 % Formamid 5 x Denhardt's 5 x SSC 0.1 % SDS 400 µg / ml Hefe t - RNA
------------------------	---

Hybridisierungsmix:	50 % Formamid 2 - 3 x Denhardt's 5 x SSC 0.1 % SDS 400 µg / ml Hefe t - RNA 32P - markierte DNA
---------------------	--

50 x Denhardts:

1 % Rinderserumalbumin
1 % Polyvinylpyrrolidon
1 % Ficoll

3.10.6. DNA - Sequenzierung nach Maxam und Gilbert

Bei diesem Verfahren wird einseitig endmarkierte DNA in vier, bzw. fünf verschiedenen Reaktionen durch chemische Reagentien basenspezifisch modifiziert und gespalten. Die Reaktionsprodukte werden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Vorgegangen wurde nach dem detaillierten Protokoll von Maxam und Gilbert (1977; 1980).

Zur Auftrennung der Reaktionsprodukte dienten meist keilförmige 5% ige Polyacrylamid - Harnstoffgele (an der Auftragstelle 0.1 mm Dicke, am unteren Ende 0.4 mm Dicke), was durch die Anordnung von verschiedenen langen Spacern erreicht wurde. Dadurch erzielte man gleichmäßigere Abstände zwischen den einzelnen Banden. Die untere thermostatisierbare Platte wurde zweimal silikonisiert, die obere Platte mit einer Bindsilanlösung behandelt. Man erreichte dadurch, daß das Gel nach dem Trennen der Platten an der oberen Glasplatte haften blieb. Die steril filtrierte Gellösung wurde bei gleichzeitigem Übereinanderschieben der Glasplatten langsam eingefüllt. Die Gellänge betrug 600 mm, die Elektrophorese wurde bei einer Leistung von 25 Watt in TEB - Puffer mit der thermostatisierbaren Sequenzgelapparatur der Firma LKB (Makrophor™) durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten in 10 % ige Essigsäure eingelegt, um den Harnstoff herauszuwaschen und anschließend bei 80°C getrocknet. Auf das trockene Gel wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und 2-3 Tage bei Raumtemperatur exponiert.

Gellösung für 5 % ige Gele:

4.74 g Acrylamid
250 mg Bisacrylamid
42 g Harnstoff
10 ml 10 x TEB
ad 100 ml H₂O bidest
0.8 ml 10 % APS
50 µl TEMED

Bindsilan:

18.7 µl gamma - metharyloxypropyl -
trimethoxy silan
187.5 µl 10 % Essigsäure
6.25 ml Ethanol

3.10.7. DNA - Sequenzierung nach dem Dideoxyverfahren

Das ursprünglich für die enzymatische Synthese an einzelsträngigen DNA - Templates von Sanger (1977) entwickelte Verfahren, kann auch, wie von Wallace und Mitarbeitern (1981) gezeigt wurde, für doppelsträngige DNA angewendet werden, falls geeignete synthetische Oligonukleotidprimer zur Verfügung stehen.

Dieses Verfahren ermöglicht ein schnelleres Vorgehen als bei der Sequenzierung nach Maxam und Gilbert, da zum einen direkt aus dem Plasmid, unabhängig von vorhandenen Restriktionsschnittstellen sequenziert werden kann, zum anderen keine vorausgehenden Markierungs- und Reinigungsschritte nötig sind.

Vorgegangen wurde nach dem von P. Heinrich ausgearbeiteten Leitfaden zum Plasmid - Sequenzieren (1986).

Die zu sequenzierende DNA (im allgemeinen 2 µg) wurde lyophilisiert und mit 40 µl Denaturierungspuffer bei Raumtemperatur fünf Minuten denaturiert. Nach Zugabe von 4 µl Neutralisierungspuffer folgte eine Ethanol-fällung. Das abzentrifugierte DNA - Pellet wurde dann in einem Gesamtvolumen von 15 µl zusammen mit 10 pmol Primer, 1.5 µl 10 x Annealing - Puffer und 2 µl [³⁵S]-dATP (8 µCi / ml ; 650 Ci / mmol) aufgenommen und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 µl Klenow - DNA - Polymerase (2 U / µl) dazupipettiert, gemischt und je 3 µl in vier vorbereitete Reaktionsgefäße überführt, die je 2 µl der entsprechenden dNTP, ddNTP - Mischungen enthielten. Die Reaktion wurde 20 Minuten bei 37°C durchgeführt, dann je 1.5 µl Chase - Mix (0.125 mM aller 4 dNTP's) zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Die Proben wurden dann unter Vakuum getrocknet und in je 4 µl Auftragspuffer gelöst und bis zum Auftragen auf das Sequenzgel bei -80°C aufbewahrt. Vor der Elektrophorese wurden die Proben drei Minuten im Wasserbad gekocht und dann sofort auf Eis gestellt. Pro Spur wurde etwa 1 µl aufgetragen. Die Elektrophorese wurde wie unter 3.10.6. beschrieben durchgeführt.

Denaturierungspuffer:	0.2 M NaOH 0.2 mM EDTA pH 8
Neutralisierungspuffer:	2 M Ammoniumacetat pH 4.5
10 x Annealing - Puffer:	70 mM Tris - HCl pH 7.5 70 mM MgCl ₂ 300 mM NaCl 100 mM DTT 1 mM EDTA pH 8
Universalprimer:	5'- TCCCAGTCACGACGT -3'
Reverser Primer:	5'- AACAGCTATGACCATG -3'
Nukleotid - Mischungen:	0.5 mM dNTP's 2 mM ddNTP's
Chase - Lösung:	0.125 mM dNTP's
Formamid - Farbstoff - Mix:	98 % entionisiertes Formamid 10 mM EDTA pH 8 0.2 % Bromphenolblau 0.2 % Xylencyanol

3.11. DNA - Proteinkomplexe

3.11.1. Nachweis durch Filterbindungstest

Der Filterbindungstest basiert auf der Eigenschaft von Nitrozellulosefiltern, unter geeigneten Bedingungen DNA - Proteinkomplexe zu binden, während freie DNA nicht zurückgehalten wird (Riggs et al., 1968, 1970)

Die experimentelle Durchführung erfolgte in Anlehnung an Nagata und Mitarbeiter (1983).

Radioaktiv markierte DNA - entweder Oligonukleotide oder Restriktionsfragmente - wurde 10 bis 15 Minuten in einem Gesamtvolumen von 40 - 50 µl in Bindepuffer mit Kernrohextrakt inkubiert. Dabei ist wichtig, daß der Natriumchlorid - Gehalt des Ansatzes 150 mM nicht wesentlich über - oder unterschreitet. Im allgemeinen wurden 5 - 20 fmol DNA und etwa 2 µg Rohextrakt eingesetzt. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß mit Filterbindungspuffer aufgefüllt und über Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schüll BA 85, 45 µm, in Puffer äquilibriert) auf einer Vakuumfiltrations - apparatur gefiltert. Jedes Filter wurde zweimal mit je 1.5 ml Puffer

nachgewaschen, mindestens eine Stunde bei 80°C getrocknet und die zurückgehaltene DNA - Menge im Szintillationszähler gemessen.

Bindepuffer:	50 mM Hepes - KOH pH 7.5
	1 mM EDTA
	5 mM DTT
	10 % Glycerin
	0.15 M NaCl

3.11.2 Elution der gebundenen DNA von Nitrozellulosefiltern

Um an Nitrozellulose gebundene DNA - Fragmente charakterisieren zu können, mußte die DNA vom Filter eluiert werden.

Dazu wurde das Filter für ein bis zwei Stunden mit maximal 1ml Elutionspuffer bei 37°C geschüttelt. Durch Zusatz von Proteinase K zum Puffer erzielte man einen Abbau des an die DNA gebundenen Proteins. Die DNA - haltige Lösung wurde durch Phenolextraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Die DNA steht dann einer Analyse durch Gelelektrophorese und für DNA/DNA - Hybridisierung zur Verfügung.

Elutionspuffer:	10 mM Tris - HCl pH 7.4
	5 mM EDTA
	0.2 % SDS
	50 µg / ml Proteinase K

3.11.3. Nachweis im Gelretentionstest

Eine alternative Methode zum Nachweis von DNA - Protein - Interaktionen beruht auf der Beobachtung von Fried und Crothers (1981), daß DNA - Proteinkomplexe in native Polyacrylamidgele hineinwandern und während der Elektrophorese stabil bleiben.

5 - 20 fmol radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 - 3 µg Protein aus Rohextrakt in Bindepuffer (s. 3.11.1.) inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug im allgemeinen 40 µl. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 1 / 10 Volumen Auftragspuffer sofort der Elektrophorese unterworfen.

Es wurden 11 % ige native Polyacrylamidgele pH 8.8 verwendet (Acrylamid / Bisacrylamid = 44 / 0.8). Als Elektrophoresepuffer diente Tris - Glycin - Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA für 8 Stunden. Anschließend

wurden die Gele für 30 bis 60 Minuten in Fixierlösung (40 % Methanol, 10 % Eisessig) gebadet, getrocknet und bei - 80° C autoradiographiert.

Wurden längere DNA - Fragmente in den Gelretentionstest eingesetzt, mußte die Polyacrylamidkonzentration gesenkt werden. Für Fragmentlängen von 200 - 300 bp erwiesen sich 7 % ige Gele als geeignet. Der Test wurde wie für Oligo - nukleotide beschrieben durchgeführt.

Auftragspuffer:	0.625 M Tris - HCl pH 6.8
	25 % Glycerin
	0.05 % Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer:	0.05 M Tris
	0.4 M Glycin

Herstellung von nativen Polyacrylamidgelen:

	<u>11 %</u>	<u>7%</u>	<u>5%</u>
PAA (44 / 0.8)	8.75 ml	5.5 ml	4 ml
Tris - HCl pH 8.8 (1.5 M)	8.75 ml	8.75 ml	8.75 ml
1 % APS	1.6 ml	1.6 ml	1.6 ml
H ₂ O _{bide} st	15.9 ml	19.15 ml	20.65 ml
TEMED	70 µl	70 µl	70 µl

3.11.4. Quantifizierung der Gelbanden

Um eine Auswertung der Gele vornehmen zu können, d.h. die Menge des im Gel festgehaltenen DNA - Proteinkomplexes zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet.

Für eine Auswertung im Scanner (Automatic TLC Linear Analyzer, Fa. Berthold) wurde zuerst der entwickelte Röntgenfilm exakt auf dem getrockneten Gel positioniert und die Lage der DNA- Proteinbanden markiert. Die Menge der gebundenen Radioaktivität konnte dann mit dem Zählrohr des Scanners ermittelt werden. Über die pro Spur eingesetzte Menge an DNA, deren spezifische

Aktivität durch TCA - Fällung bestimmt worden war, konnte die den einzelnen Banden entsprechende Menge an DNA - Proteinkomplex berechnet werden.

Für die Auswertung im Flüssigkeits - Szintillationszähler wurden die durch Aufliegen des Röntgenfilms markierten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und nach Zugabe von Toluol die gebundene Aktivität bestimmt.

Für exakte quantitative Auswertungen wurden im allgemeinen beide Meßmethoden parallel durchgeführt.

3.11.5. DNAse I - Footprint

Zur Aufklärung sequenzspezifischer Bindung von Proteinen an DNA sind Techniken entwickelt worden, die eine präzise Lokalisierung von Protein - Bindungsstellen auf der DNA erlauben.

Limitierter Verdau von DNA in Gegenwart und Abwesenheit von Protein mit dem Enzym DNAse I, liefert bei Analyse der Spaltprodukte auf einem Sequenzgel einen so genannten "Fußabdruck" (= footprint), da die Bereiche auf der DNA , an die ein Protein bindet, vor DNAse - Abbau geschützt sind und im Vergleich zu den Spuren ohne Protein ein "Fenster" im Bandenmuster auftritt.

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Galas und Schmitz (1978).

Je ca. 3 ng endmarkiertes DNA - Fragment wurden mit 150 ng Carrier - DNA und 3 µg Protein in Bindepuffer, dem zusätzlich 10 mM MgCl₂ zugesetzt worden war, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der anschließende DNAse - Verdau wurde mit 2.5 µl DNAse I (0.1 mg / ml) bei 20°C durchgeführt. Nach 2, 4, 8, 12 und 16 Minuten wurden Aliquots entnommen und mit dem gleichen Volumen Maxam - Gilbert - Stoppuffer versetzt. Parallel wurde die Reaktion ohne Protein ausgeführt. Die Ansätze wurden auf ein 8 % iges Sequenzgel (s. 3.10.6.) aufgetragen. Zusätzlich wurde das DNA - Fragment nach der Vorschrift von Maxam und Gilbert sequenziert und auf dem selben Gel aufgetrennt. Auf diese Weise konnte im Autoradiogramm die Sequenz des vom Protein geschützten Bereichs abgelesen werden.

3.11.6. Exonuklease III - Footprint

Exonuklease III aus *E.coli* ist eine 3' → 5'- Exonuklease, die ausschließlich doppelsträngige DNA - Moleküle von ihren 3'- Enden her abbaut. Proteine, die an die DNA gebunden sind, verhindern einen weiteren Abbau durch das Enzym und erzeugen so Fragmente spezifischer Länge.

Die Durchführung erfolgte nach der Beschreibung von Wu (1985).

Pro Ansatz wurden 3 ng eines radioaktiv markierten DNA - Fragments in 50 µl Exo III - Bindepuffer mit 3 µg Protein für 20 Minuten bei 24°C inkubiert. Als unspezifische Carrier wurden 1 µg mit Hae III - gespaltene pBR 327 - DNA und 10 µg t - RNA aus Hefe zugesetzt.

Nach dem Bindungsschritt wurden die Ansätze mit unterschiedlichen Mengen von Exonuklease III (12, 50, 100 Einheiten) für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle wurden die gleichen Ansätze ohne Protein durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von einem Volumen 20 mM EDTA, 1 % SDS gestoppt, die DNA durch zweimalige Phenolisierung gereinigt und mit Ethanol gefällt. Das DNA - Sediment wurde getrocknet und in 5 µl Maxam - Gibert - Stoppuffer aufgenommen.

Die Elektrophorese wurde auf einem 5 % igen Sequenzgel wie unter 3.10.6. beschrieben ausgeführt. Als Längenmarker diente mit Hpa II - geschnittene pBR 327 - DNA, die nach der Spaltung mit T4 - Kinase radioaktiv markiert worden war.

Exo III - Bindepuffer:

75 mM NaCl
5 mM MgCl₂
0.1 mM EGTA
10 mM Tris - HCl pH 7.4
0.5 mM DTE
2 mM Na - Phosphat pH 7
5 % Glycerin

Der Puffer wurde 5 - fach konzentriert angesetzt.

4. E R G E B N I S S E

4.1. Verwendung von Kernextrakten für DNA - Proteinbindungsstudien

Um DNA - Proteinbindungsstudien durchführen zu können, ist es erforderlich, geeignete Quellen zu finden, die das zu untersuchende Protein in ausreichender Menge liefern.

Die ersten Versuche mit Nuklearfaktor I wurden mit Kernextrakten aus HeLa - Zellen durchgeführt. Da bedingt durch den Labormaßstab aber nur eine limitierte Menge an Zellen zur Verfügung stand, wurde von R. Schneider (1986) ein Verfahren entwickelt, nach dem Kernextrakte in großer Menge aus Schweineleber isoliert werden konnten, die gleich gute oder sogar bessere Ergebnisse in DNA - Bindungstests ergaben.

Für die Arbeiten am Mausadenovirussystem sollten aber möglichst Extrakte verwendet werden, die aus dem Wirt des Virus stammten, nämlich der Maus. Dazu wurden zunächst Kernextrakte aus Mausfibroblasten der Zelllinie 3T3 hergestellt. Da sich diese Extrakte als wenig stabil erwiesen, wurden im folgenden auf Grund der guten Ergebnisse mit Schweineleberextrakten Kernextrakte aus Mäuselebern verwendet, die sich vor allem im Gelretentions - test sehr bewährt haben.

4.2. Identifizierung sequenzspezifischer Bindestellen für Nuklearfaktor I im Genom des Mausadenovirus AdFL

4.2.1. Isolierung von NF I - bindenden DNA - Fragmenten durch Filterbindungstests

Je 5 µg AdFL - DNA wurden mit den Restriktionsenzymen Pst I, Hind III, Hpa I, und Bgl I vollständig gespalten.

Zur Untersuchung der Proteinbindungsaktivität wurden die Fragmentgemische in einen Filterbindungstest eingesetzt. Dazu wurden 50, bzw. 200 ng der

gespaltenen DNA mit dem zehnfachen Überschuß pUC8 - DNA als unspezifischem Kompetitor und 2 µg Kernextrakt aus Schweineleber, der über eine Anionenaustauschersäule (Mono Q) angereinigt worden war, 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit Bindepuffer (s. 3.11.1) inkubiert. Die Ansätze wurden auf Nitrozellulosefilter aufgebracht. Danach wurden die am Filter zurückgehaltenen DNA - Fragmente eluiert und die DNA auf einem 1 % igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Neben die Spur mit der eluierten DNA wurde jeweils die mit dem entsprechenden Enzym gespaltene DNA aufgetragen. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde die DNA in einem Southern - Blot auf Nitrozellulose übertragen und mit durch Nicktranslation radioaktiv markierter AdFL - DNA hybridisiert und autoradiographiert.

Mit Hilfe der Restriktionskarten von AdFL (s. Anhang)) konnten die im Autoradiogramm sichtbaren eluierten DNA - Fragmente ihrer Lage im Genom zugeordnet werden (Abb. 4.1.und 4.2.).

Aus Abbildung 4.2. geht hervor, daß jeweils das linke und rechte Endfragment der Virus - DNA und zusätzlich ein internes Fragment vom Kernextrakt gebunden wurden. Wie im Autoradiogramm deutlich zu erkennen ist, ergaben die rechten Endfragmente ein stärkeres Signal als die anderen beiden Fragmente. Aus den vorliegenden Sequenzdaten (Antoine, 1984) war bereits bekannt, daß die Erkennungssequenz für die NF I - Bindestelle in den beiden Endfragmenten von AdFL innerhalb der terminalen Repetition vorkommt (s. Anhang). Erstaunlicherweise fand man aber im rechten Ende der Virus - DNA, 30 Bp außerhalb des ITR eine weitere Konsensussequenz für die Bindung von NF I. Falls NF I tatsächlich an beide Sequenzen bindet, wäre das eine Erklärung für die im Autoradiogramm sichtbare stärkere Intensität der rechten Endfragmente.

Da sich alle weiteren Arbeiten auf die Endfragmente von AdFL beschränkten, soll an dieser Stelle nur erwähnt werden, daß G. Stelzer durch Filterbindungs - tests mit kleineren DNA - Fragmenten das interne NF I - bindende Fragment auf den Bereich zwischen 70.2 % und 75.3 % des AdFL - Genoms eingrenzen konnte.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

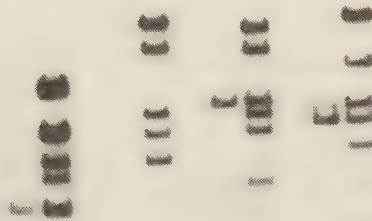


Abb. 4.1.

Autoradiogramm der nach Filterbindungstest eluierten AdFL - Restriktions -
fragmente ;

1 - 3: Pst I - Spaltung; Spuren 1 + 2 zeigen die Hybridisierung von 50, bzw
200 ng der vom NC - Filter eluierten AdFL - Fragmente, in Spur 3 ist das
Spaltmuster von AdFL mit Pst I dargestellt.

4 - 6: Hind III - Spaltung, Reihenfolge wie in Spuren 1 - 3

7 - 9: Hpa I - Spaltung

10 - 12: Bgl I - Spaltung

Hybridisierungsprobe: ^{32}P markierte AdFL - DNA

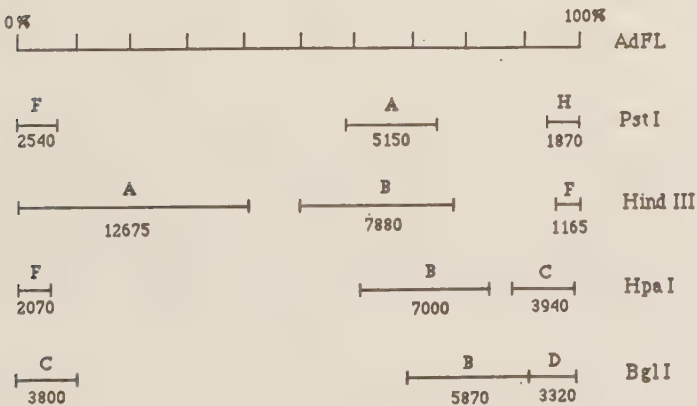


Abb.4.2.

Schematische Darstellung der von NF I gebundenen AdFL - Fragmente (in bp)

4.2.2. Nachweis von NF I - Bindestellen durch Footprintanalysen

Um die Bindung von NF I an bestimmte Sequenzen auf der DNA nachzuweisen, wurden in Zusammenarbeit mit G. Stelzer sogenannte Footprint-Experimente durchgeführt.

4.2.2.1. DNAse - Footprint

Für den DNAse - Footprint wurde ein rekombinantes pUC8 - Plasmid eingesetzt, in dessen Pst I - und Sma I - Schnittstellen des Polylinkers das 1817 bp große Pst I - H - Fragment von AdFL kloniert worden war. Der Klon wurde freundlicherweise von G. Antoine zur Verfügung gestellt. Die Plasmid - DNA wurde mit Eco R I linearisiert und an den 5'-Enden mit T4 - Kinase radioaktiv markiert. Um ein nur an einem 5'-Ende markiertes Fragment zu erhalten, wurde die DNA mit Hind III nachgeschnitten und das 1165 Bp lange Eco R I / Hind III - Fragment über ein Agarosegel gereinigt. Die Konstruktion des verwendeten Plasmids ist in Abbildung 4.3. dargestellt.

Die DNAse - Footprintanalyse wurde parallel mit Rohextrakt aus Schweine - Leberkernen und mit teilweise gereinigtem Protein durchgeführt.

Ungefähr 3 ng endmarkierte DNA und 150 ng mit Hae III gespaltene pBR 327 - DNA als Carrier wurden in DNAse - Bindepuffer sowohl mit als auch ohne Protein vorinkubiert und anschließend einem partiellen Verdau mit 250 ng DNAse I ausgesetzt. Der Verdau wurde nach verschiedenen Zeiten durch Zugabe von Maxam - Gilbert - Stopppuffer beendet und die Produkte auf einem 8 % igen denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. In parallelen Spuren wurden Maxam-Gilbert-Sequenzreaktionen des verwendeten Fragments auf das Gel aufgetragen, um die Sequenz der vom Protein geschützten Region bestimmen zu können. Das Autoradiogramm (Abb. 4.4.) zeigt deutlich einen DNAse - geschützten Bereich zwischen Position 118 und 145 des AdFL - Fragments, innerhalb dessen eine der beiden NF I - Konsensussequenzen liegt (125 - 137). Der Bereich um die andere Konsensussequenz wurde in diesem Versuch nicht vor DNAse - Abbau geschützt.

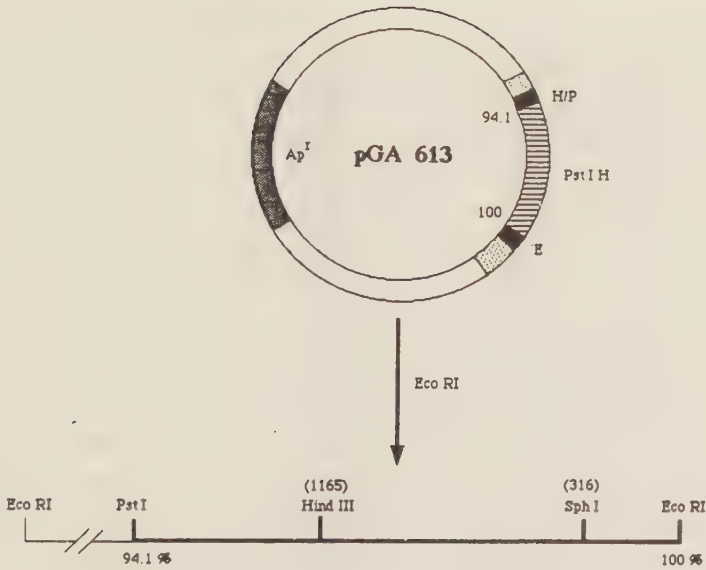


Abb. 4.3.

Plasmid pGA 613

Der obere Teil der Abbildung zeigt das Ausgangsplasmid, das zur Isolierung des Eco RI / Hind III - Fragments für die Verwendung im DNase-Footprint eingesetzt wurde. Getüpfelte Bereiche bezeichnen das lac Z-Gen, der Polylinker ist schwarz gezeichnet. Das Pst I H - Fragment aus AdFL ist schraffiert dargestellt. H: Hind III; P: Pst I; E: Eco RI

Im unteren Teil der Abbildung ist das mit Eco RI linearisierte Plasmid dargestellt. Für den Einsatz im DNase - Footprint wurde das 1165 bp lange Eco RI / Hind III verwendet. Die Zahlen in Klammern geben die Position der Schnittstellen in der AdFL - DNA an.

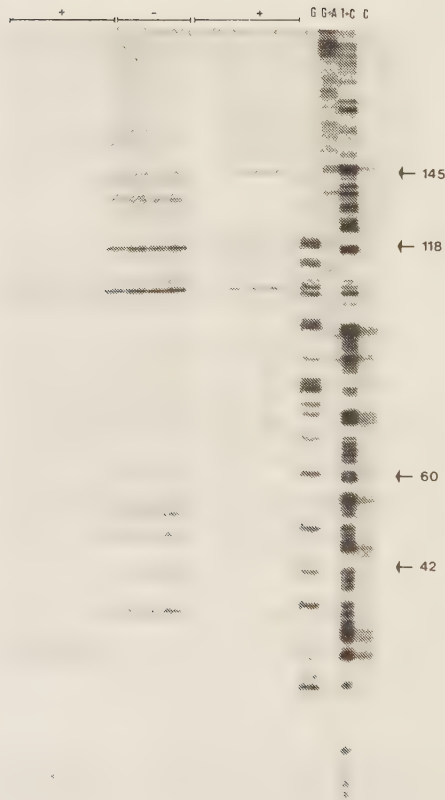


Abb. 4.4.

DNase I - Footprint des rechten Endes von AdFL - DNA

In den ersten fünf Spuren wurde das Fragment mit Rohextrakt aus Schweineleber inkubiert, der DNase - Verdau wurde jeweils nach 2, 4, 8 und 12 Min. gestoppt. Die mittleren Spuren zeigen den DNase - Abbau ohne Zugabe von Protein, in den letzten Spuren wurde Mono Q - gereinigter Extrakt zugesetzt. Im rechten Teil des Gels ist die Maxam - Gilbert - Sequenz des entsprechenden Bereichs aufgetragen. Pfeile bezeichnen Bereiche mit NF I - Bindestellen.

4.2.2.2 Exonuklease III - Footprint

Eine weitere Möglichkeit zur genauen Lokalisierung von spezifischen Schnittstellen auf der DNA ist der Schutz vor Exonuklease III - Abbau. Dieser Test, der von Wu (1985) unter anderem zum Nachweis der Bindung von Hitzeschock - Elementen (HAP) angewendet wurde, ist empfindlicher als die DNase - Footprint - Technik, da auch Nuklease - resistente DNA - Fragmente identifiziert werden können, die im Vergleich zur gesamten DNA in geringen Mengen vorkommen.

Der Versuch wurde wie bei Wu (1985) beschrieben durchgeführt.

Es wurde das 325 Bp große Eco R I / Hind III - Fragment des Klons 8318 eingesetzt, das die ersten 316 Bp (Eco R I / Sph I) des rechten Endes von AdFL enthält (s. Abb.4.6.).

Obwohl in der Regel für derartige Experimente Fragmente verwendet werden, die nur an einem Ende markiert sind, wurde in diesem Fall aus praktischen Erwägungen - Schnittstellen, die sehr nahe an einer radioaktiv markierten Stelle liegen, sind für Restriktionsenzyme schwer zugänglich - darauf verzichtet, eine der beiden 5' - Markierungen durch Nachschneiden zu entfernen. Auf Grund der bereits bekannten Daten konnten die zu erwartenden Fragmente, die durch Exonuklease III - Abbau von beiden 3' - Enden her entstehen sollten, im voraus berechnet werden.

Das Fragment wurde mit T4 - Kinase an den 5' - Enden mit ^{32}P markiert und wie unter 3.11.1. beschrieben sowohl mit Rohextrakt als auch mit angereinigtem Kernextrakt aus 3T3 - Zellen inkubiert und dann einem limitierten Exonuklease III - Abbau mit unterschiedlichen Enzymmengen unterworfen. Parallel dazu wurde das Eco R I / Hind III - Fragment mit Sma I gespalten und das Gemisch aus beiden Fragmenten, die nun jeweils nur an einem Ende markiert waren, ebenfalls in den Versuch eingesetzt. Beide Ansätze wurden außerdem ohne Zugabe von Protein durchgeführt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem 5 % igen Sequenzgel.

Abbildung 4.5. zeigt das Autoradiogramm des Gels. Als Größenmarker wurde mit Hpa II - gesplattene pBR 327 - DNA verwendet.

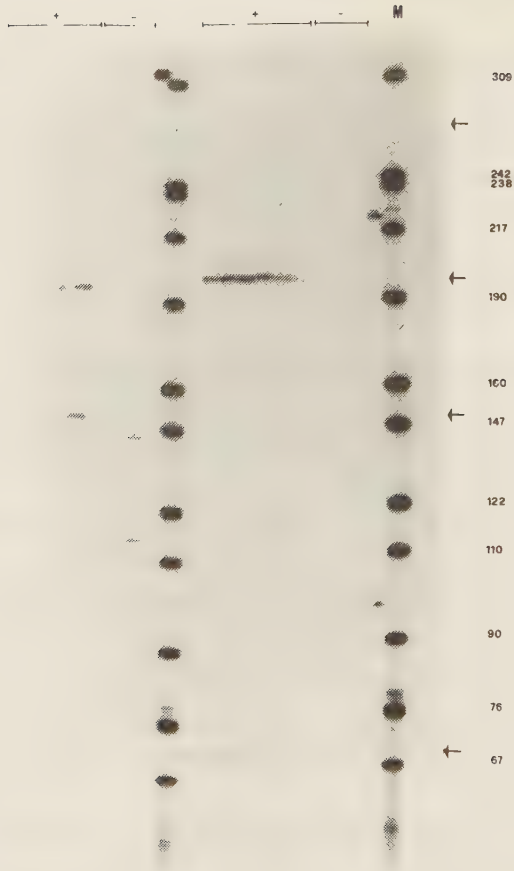


Abb. 4.5.

Exonuklease III - Footprint des rechten Endes von AdFL

Der linke Teil des Autoradiogramms zeigt Exo III - Stops, die bei Einsatz des Eco RI/Hind III - Fragments entstanden (jeweils mit und ohne Kernextrakt). Im rechten Teil sind die nach Spaltung mit Sma I auftretenden Stops sichtbar. Pfeile zeigen die Position der Exonuklease III - Fragmente, Zahlen bezeichnen die Fragmentlängen des Markers

1-3: 3T3 - Rohextrakt mit 12, 50 und 100 U Exonuklease III

4-6: 3T3 - Extrakt (Mono Q)

7-9: ohne Protein

8: Fragment ohne Enzym und Protein

9: Marker

10-19: wie 1-9

Im abgebildeten Autoradiogramm treten in den Spuren mit Protein Fragmente von definierter Länge auf, die durch Exonuklease III - Stops entstanden sind. In Abbildung 4.6. ist deren Entstehung schematisch dargestellt.

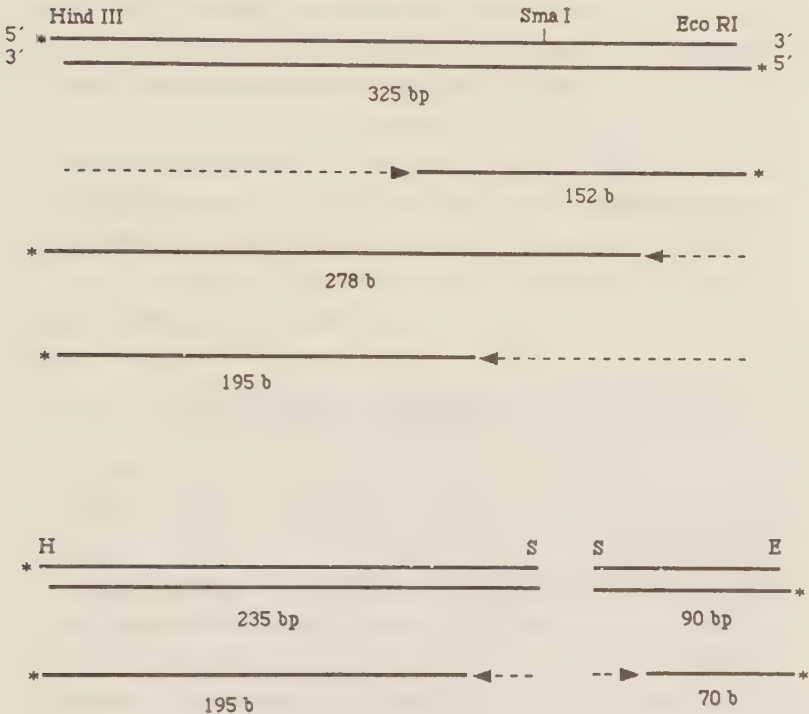


Abb. 4.6.:

Darstellung der im Exonuklease III - Footprint entstehenden Fragmente. Gestrichelte Pfeile geben die Richtung und Länge des von Exonuklease III abgebauten DNA - Fragments an. Durchgezogene Striche zeigen die übrig bleibenden einzelsträngigen DNA - Fragmente. Deren Länge ist in Basen angegeben.

Auf Grund der Fragmentlängen können zwei Bereiche auf der DNA eingegrenzt werden, die resistent gegenüber Exonuklease III sind.

Das ist einmal der Bereich zwischen den Positionen 130 und 152, der mit dem im DNase - Footprint charakterisierten Bereich korreliert; zusätzlich tritt eine zweite geschützte Region zwischen den Positionen 45 und 70 auf, die der erwarteten NF I - Bindestelle innerhalb des ITR entspricht.

Die höhere Empfindlichkeit dieser Technik hat erstmals den Nachweis ermöglicht, daß im rechten Ende des AdFL - Genoms tatsächlich zwei NF I - Bindestellen vorkommen. Zusammen mit dem Ergebnis des DNase - Footprints konnten auch erste Hinweise auf eine unterschiedliche Affinität von NF I für die beiden DNA - Sequenzen abgeleitet werden.

Im DNase - Footprint konnte nur der Bereich außerhalb der terminalen Repetition von AdFL als geschützt identifiziert werden. Da auch im Exonuklease III - Versuch ein 70bp langes Fragment fehlt, das man beim Abbau des ungeschnittenen Fragments von der Hind III - Seite her erwarten würde, läßt das die Vermutung zu, daß für die Bindestelle um Position 140 eine höhere Affinität für NF I besteht als für die Bindestelle im ITR.

4.3. Untersuchungen zur DNA - bindenden Aktivität von NF I im Gelretentionstest

Mit Hilfe von Filterbindungstests und Footprint - Experimenten war nachgewiesen worden, daß im rechten Ende des AdFL - Genoms zwei NF I - Bindestellen vorkommen.

Um exakte qualitative und quantitative Aussagen über das Bindungsverhalten von NF I machen zu können, war es wünschenswert, ein schnelles und empfindliches Testsystem zur Verfügung zu haben. Ein derartiges System ist von Garner und Rezvin (1981) sowie von Fried und Crothers (1981) entwickelt worden. Der Test beruht auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität von DNA - Proteinkomplexen und freier DNA. Am Beispiel der Bindung von lac - Operator und lac - Repressor zeigten Fried und Crothers, daß die gebildeten Operator - Repressor - Komplexe in die Gelmatrix eines nicht - denaturierenden Polyacrylamidgels hineinwandern und während der Elektrophorese stabil bleiben. Diese unerwartete Stabilität ist bisher nicht völlig verstanden, könnte aber unter anderem auf einer "käfigartigen" Stabilisierung durch die Gelmatrix beruhen, die eine langsamere Dissoziation bewirken würde.

Verwendet man radioaktiv markierte DNA - Fragmente, kann das Bandenmuster von DNA - Proteinkomplexen und freier DNA durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Dieser Test ist prinzipiell auf alle sequenzspezifische DNA - bindende Proteine übertragbar, sofern die Bindestelle bekannt ist.

Der Einsatz von kurzen, synthetisch hergestellten Oligonukleotiden, die die bekannte oder erwartete Erkennungssequenz tragen, erleichtert im Gegensatz zu mehreren hundert Basenpaar großen DNA - Fragmenten die Analyse von Kern - extrakten, die mehrere DNA - bindende Proteine enthalten können.

Die Bedingungen für den Gelretentionstest wurden von R. Schneider an unserem Institut für NF I - haltige Kernextrakte optimiert und sind unter 3.11.3. beschrieben (Schneider et al., 1986)

Für die Bindungsstudien wurden die in Abbildung 4.7. dargestellten Oligonukleotide eingesetzt.

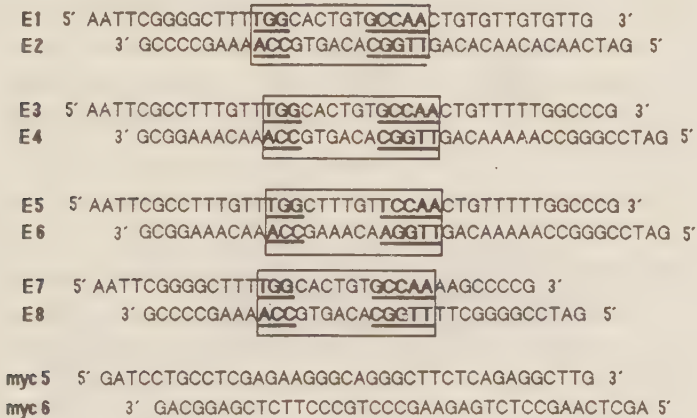


Abb. 4.7.:

Im Gelretentionstest eingesetzte Oligonukleotide
 Oligonukleotid E₁E₂ enthält die NF I - Bindestelle außerhalb des ITR von AdFL (Position 116 bis 151), E₅E₆ die Bindestelle innerhalb des ITR (34 bis 71). In E₃E₄ ist die Erkennungssequenz von E₁E₂ in die Umgebung von E₅E₆ transferiert worden. E₇E₈ stellt ein vollständig symmetrisches Oligonukleotid dar mit der Erkennungssequenz von E₁E₂. Der 5' flankierende Bereich der Erkennungsstelle (124 - 137) wiederholt sich in umgekehrter Richtung im 3' flankierenden Teil des Oligonukleotids. myc₅myc₆ ist ein Oligonukleotid aus dem Promotorbereich des c-myc Gens

Die Oligonukleotide E₁E₂ und E₅E₆ entsprechen den beiden NF I - Bindestellen im rechten Ende von AdFL ; E₃E₄ und E₇E₈ stellen Oligonukleotide dar, die außerhalb der NF I - Erkennungssequenz mutiert sind und somit Aussagen über einen möglichen Einfluß der unmittelbaren Umgebung der Erkennungssequenz auf die Bindung zulassen. Das Oligonukleotid myc₅myc₆ wurde als Kontroll - oligonukleotid eingesetzt, da es keine Bindestelle für NF I enthält.

In Rohextrakten kommen neben dem Protein, das sequenzspezifisch an eine gegebene DNA bindet, zusätzlich zahlreiche unspezifische DNA - bindende Proteine vor. Diese konkurrieren mit dem gesuchten Protein um die im Test eingesetzte DNA. Durch Zugabe von unmarkierter, heterologer Kompetitor - DNA, wie zum Beispiel mit Restriktionsenzymen gespaltene *E. coli* - DNA, Lachssperma - DNA oder Plasmid - DNA, kann dieser Effekt verringert werden. Allerdings binden selbst sequenzspezifische Proteine mit geringer Affinität an "zufällige" DNA - Sequenzen. Darüberhinaus ist bekannt, daß die Konsensussequenz für NF I ubiquitär verbreitet ist. Man findet sie zum Beispiel in HeLa - DNA alle 100 - 200 KB (Gronostajski et al., 1984). Deshalb wurde als Kompetitor - DNA das alternierende Copolymer poly dIdC eingesetzt, wodurch die unspezifischen Interaktionen minimiert werden konnten.

In einen typischen Gelretentionstest wurden zwischen 5 und 10 fmol radioaktiv markierte Oligonukleotide eingesetzt, mit dem 1000 - 2000 - fachen Überschuß an poly dIdC gemischt, nach Zugabe von Rohextrakt aus Mäuseleberkernen (ca. 2 µg Protein) in Bindepuffer (150 mM NaCl) für 10 - 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der gebildete DNA - Proteinkomplex erscheint als diskrete Bande im Autoradiogramm. Wurde der Versuch ohne Zugabe von dIdC durchgeführt, blieb im allgemeinen ein Teil des markierten Oligonukleotids an der Auftragstelle hängen, vermutlich auf Grund der Bindung eines Überschusses von unspezifischen Proteinen. Außerdem traten zusätzliche Banden auf, die mit nicht - spezifischen Interaktionen des Oligonukleotids mit Proteinen des Rohextrakts zu erklären sind.

Abbildung 4.8. zeigt das Autoradiogramm eines Gelretentionstests, bei dem die Bindung von NF I aus Rohextrakt an die Oligonukleotide E_1E_2 und myc_5myc_6 verglichen wurde. Es wurden je 10 fmol radioaktiv markierte DNA (8000, bzw. 10000 cpm / fmol) mit 500 ng dIdC versetzt und in einem Reaktionsvolumen von 40 μ l 10 Minuten mit 3 μ l Rohextrakt (2 μ g Protein) inkubiert. Die Elektrophorese wurde für fünf Stunden bei 20 mA auf einem 11 % igen nativen Polyacrylamidgel pH 8.8 durchgeführt.



Abb. 4.8.

Beispiel für einen Gelretentionstest

- 1: 10 fmol E_1E_2 ohne Protein
- 2: 10 fmol myc_5myc_6 ohne Protein
- 3: 10 fmol E_1E_2 inkubiert mit 2 μ g Protein aus Rohextrakt ; 500 ng dIdC
- 4: 10 fmol myc_5myc_6 inkubiert mit 2 μ g Protein aus Rohextrakt ; 500 ng dIdC
- 5: wie 3 ; ohne dIdC
- 6: wie 4 ; ohne dIdC

Das Autoradiogramm zeigt in Spur 3 und 5 jeweils eine deutliche Bande, die mit dem Kontrolloligonukleotid nicht auftritt. Bei der schneller laufenden Bande von schwächerer Intensität könnte es sich entweder um ein Abbauprodukt von NF I handeln oder um einen unspezifisch bindenden Faktor, der von NF I verschieden ist. Bei Zusatz von poly dIdC treten mit myc_5myc_6 unter diesen Versuchsbedingungen keine Komplexbanden auf. Das bedeutet, daß sich im Mäuseleberrohextrakt kein Protein identifizieren läßt, das spezifisch an myc_5myc_6 bindet. Ohne dIdC sind in beiden Spuren zusätzliche, offenbar durch unspezifische Bindung hervorgerufene Banden zu erkennen.

4.3.1. Nachweis der Spezifität der Bindung durch Kompetitionstest

Um zu bestätigen, daß die in Abbildung 4.8. auftretenden Banden tatsächlich auf spezifische Bindung zurückzuführen sind, wurde ein Kompetitionstest durchgeführt. Dazu wurden gleiche Mengen an radioaktiv markiertem Oligonukleotid E_1E_2 (E_1E_2^*) in zwei parallelen Ansätzen zum einen mit steigenden Mengen an unmarkiertem E_1E_2 , zum anderen mit steigenden Mengen an unmarkiertem myc_5myc_6 gemischt. Die Ansätze wurden mit gleichen Mengen Rohextrakt inkubiert und wiederum auf nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. In einem solchen Versuch kompetitieren die im Ansatz enthaltenen Oligonukleotide um die Bindung an NF I gemäß Gleichungen (1) und (2) :

$$(1) \quad P + \text{E}_1\text{E}_2^* + \text{E}_1\text{E}_2 = P / \text{E}_1\text{E}_2^* + P / \text{E}_1\text{E}_2$$

$$(2) \quad P + \text{E}_1\text{E}_2^* + \text{myc}_5\text{myc}_6 = P / \text{E}_1\text{E}_2^* + P / \text{myc}_5\text{myc}_6$$

Im Gel wird jedoch nur die Bande sichtbar, die dem Anteil von $P / \text{E}_1\text{E}_2^*$ am Komplexgemisch entspricht.

Ist die Affinität des Proteins gegenüber Oligonukleotid E_1E_2 höher als gegenüber myc_5myc_6 , würde man bei der Gleichung (1) entsprechenden Versuchsreihe eine schnellere Abnahme des Anteils an $P / \text{E}_1\text{E}_2^*$ als im

Parallelansatz und somit auch einen Intensitätsverlust der korrelierenden Bande erwarten.

In Abbildung 4.9. ist das Ergebnis der beiden Versuchsreihen wiedergegeben.

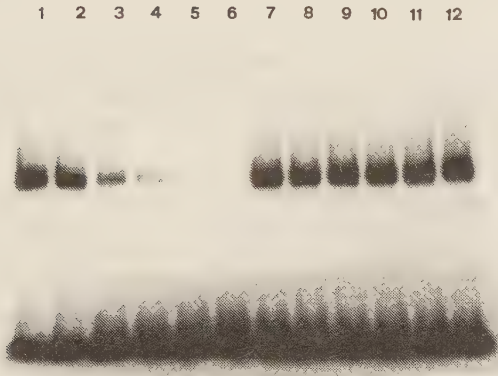


Abb. 4.9.

Kompetitionstest zum Nachweis der Bindungsspezifität

1: 10 fmol E_1E_2 *

2: + 100 fmol E_1E_2

3: + 500 fmol E_1E_2

4: + 1000 fmol E_1E_2

5: + 2500 fmol E_1E_2

6: + 5000 fmol E_1E_2

7: wie 1

8 - 12: kompetitiert mit myc_5myc_6 wie 2 - 6

Alle Proben wurden in Gegenwart von 500 ng dIdC mit 5 μ l Rohextrakt (2 μ g Protein) inkubiert.

Vergleicht man die Intensität der Komplexbande in beiden Versuchsreihen, so ist bei der Kompetition mit der NF I - Bindestelle eine deutliche Abnahme der Intensität zu beobachten. Wird hingegen mit dem Kontrolloligonukleotid kompetitiert, bleibt die Intensität der Komplexbande auch beim 500 - fachen Überschuß an Kompetitor - DNA erhalten. Damit konnte gezeigt werden, daß die Affinität von NF I an seine Erkennungssequenz um ein Vielfaches höher und somit spezifischer ist als an myc_5myc_6 .

Da die Intensität der schwachen, etwas schneller laufenden Bande auch mit dem 500 - fachen Überschuß an E_1E_2 praktisch unverändert bleibt, ist anzunehmen, daß es sich um die Bindung eines unspezifischen Proteins handelt. Offen - sichtlich ist das Auftreten dieser Bande vom verwendeten Extrakt abhängig, da sie in anderen Versuchen fehlte.

4.4. Untersuchungen zur Affinität von NF I an die Bindestellen im rechten Ende von AdFL

Da im rechten Ende des AdFL - Genoms im Gegensatz zu den menschlichen Adenoviren zwei NF I - Bindestellen vorkommen, stellte sich die Frage, ob die Bindungsaffinität an die beiden Erkennungssequenzen unterschiedlich hoch ist. Hinweise auf ein unterschiedliches Bindungsverhalten ergab bereits die DNase-Footprintanalyse (s.4.2.2.1.), bei der unter den gewählten Bedingungen nur die Bindestelle außerhalb der terminalen Repetition deutlich durch das Protein geschützt worden war.

4.4.1. Vergleich der Bindestellen durch Filterbindungstest

Die beiden Bindestellen wurden zunächst an Hand von Filterbindungstests miteinander verglichen.

Dazu wurde das Eco R I / Sph I - Fragment des Klon 8317 (s. 4.2.2.2.), das an der Eco R I - Stelle radioaktiv markiert worden war, jeweils in steigenden Mengen (50 - 200 pg) mit der gleichen Menge Protein inkubiert und die am Nitrozellulosefilter gebundene Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Parallel dazu wurde das Fragment mit dem Enzym Sma I nachgeschnitten, so daß nun nur die erste Bindestelle eine radioaktive Markierung trug (Abb.4.10 a und b). Das Gemisch der zwei entstandenen Fragmente wurde ebenfalls in steigenden Mengen mit Protein inkubiert, auf Nitrozellulosefilter aufgebracht und der Anteil der gebundenen Radioaktivität bestimmt.

In Abbildung 4.10.c wurde die gemessene Radioaktivität in cpm gegen die eingesetzte DNA - Menge aufgetragen.

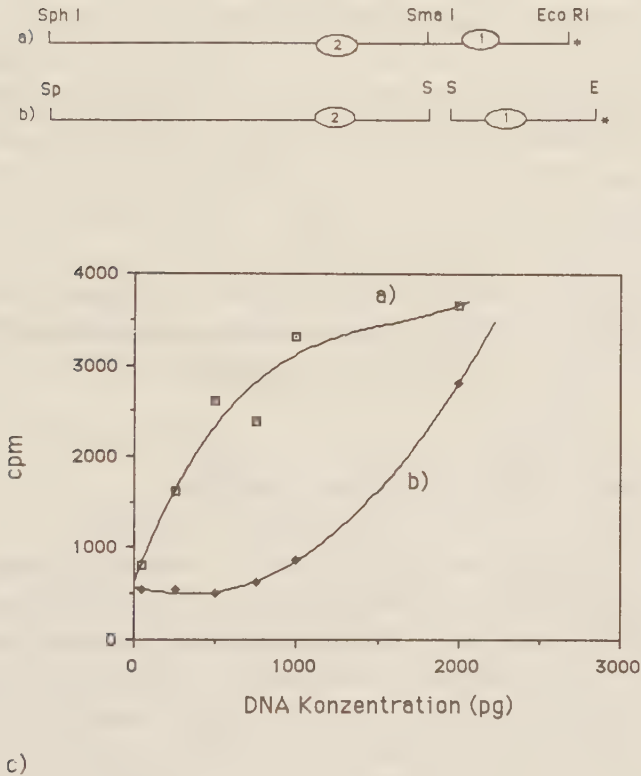


Abb. 4.10.:

Vergleich der Affinität der beiden NF I - Bindestellen im Filterbindungstest
 In Abbildung 4.10 a und b sind die verwendeten Fragmente dargestellt.
 Abbildung 4.10.c zeigt den Anstieg der im Nitrozellulosefilter zurückgehaltenen Radioaktivität in cpm (DNA - Proteinkomplex) bei Einsatz steigender Mengen DNA in picogramm.

Im ersten Versuch kann die Bindung von NF I an beide Bindestellen des Sph I / Eco R I - Fragments nachgewiesen werden, während bei Einsatz des mit

Sma I nachgeschnittenen Fragments im Filterbindungstest nur der Anteil der Bindung an die erste Bindestelle sichtbar wird. Wie aus Abbildung 4.10.c deutlich wird, geht mit steigender Menge an ungeschnittenem Fragment eine starke Zunahme an Radioaktivität einher, also der Bildung von DNA - Proteinkomplexen, so lange bis eine Sättigung erreicht ist.

Wird jedoch das gesplante Fragment in den Versuch eingesetzt, steigt die Radioaktivität erst ab ca. 500 - 1000 pg DNA an. Da die Anzahl der eingesetzten Bindestellen und die Proteinmenge in beiden Versuchsreihen gleich war, muß der unterschiedliche Kurvenverlauf mit einer höheren Affinität von NF I für die zweite Bindestelle erklärt werden. Es bilden sich bevorzugt Komplexe zwischen NF I und dem unmarkierten Sph I / Sma I - Fragment. Ist zum Beispiel die Affinität für die zweite Bindestelle zehnmal höher als an die erste, wird eine Bindung an letztere erst bei einer zehnfach höheren Menge an DNA wie in der Versuchsreihe mit dem ungeschnittenen Fragment sichtbar.

4.4.2. Ermittlung der Affinitätsunterschiede im Gelretentionstest

Da der Filterbindungstest keine Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen DNA - Proteinkomplexen zuläßt, ist es schwierig, exakte quantitative Aussagen über die Stärke der Bindung eines Proteins an bestimmte DNA - Sequenzen zu machen. Deshalb wurde in Anlehnung an Fried und Crothers (1984), die Gleichgewichtsstudien am CAP (cyclisches AMP - Rezeptor - Protein) - System beschrieben haben, in Zusammenarbeit mit M. Meisterernst ein Verfahren entwickelt, das ermöglicht, Affinitätsunterschiede bei der Ausbildung von DNA - Proteinkomplexen über die Technik des Gelretentionstests zu bestimmen.

Die Bildung von Komplexen zwischen Makromolekülen in einem biologischen System geschieht zufällig durch Diffusionsprozesse. Die Bindungen, die zwischen den interagierenden Molekülen geknüpft werden, bleiben so lange bestehen, bis der Komplex durch thermische Einwirkung auseinanderfällt. Je stärker, bzw. energiereicher die Bindung der Makro-

moleküle im Komplex ist, desto langsamer ist deren Dissoziationsgeschwindigkeit. Die Bindungsstärke zwischen zwei Molekülen ist ein Maß für die Spezifität des Erkennungsprozesses. Die Messung der Bindungsstärke erfolgt durch die Bestimmung der Gleichgewichts- bzw. Affinitätskonstante K . Je höher der Wert für diese Konstante ist, desto stärker ist die Bindung der Liganden.

Eine Reaktion, in der Molekül A an Molekül B bindet, erfolgt so lange, bis sich Bildung und Dissoziation des Komplexes im Gleichgewicht befinden.



Die Konzentrationen von A, B und dem Komplex AB werden zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K herangezogen.

Für die Berechnung von K gilt Gleichung (2) :

$$(2) \quad K_A = \frac{[AB]}{[A][B]}$$

K entspricht hier der Assoziationskonstante und wird in Liter pro Mol angegeben.

Die Gleichgewichtskonstante für die Dissoziation eines Komplexes wird nach Gleichung (3) berechnet und in Mol pro Liter angegeben.

$$(3) \quad K_D = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

In unserem Fall entspricht $[AB]$ der Konzentration des Komplexes aus NF I und DNA, c_k , $[A]$ der Konzentration der DNA, c_o , und $[B]$ der Proteinkonzentration c_p im Gleichgewicht.

Damit gilt nach Gleichung (2) :

$$(2a) \quad K_A = \frac{c_k}{c_o \times c_p}$$

wobei c_o und c_p für die Konzentrationen von Oligonukleotid und Protein im Gleichgewicht stehen. Für die in den Versuch eingesetzten Ausgangskonzentrationen c_o^0 und c_p^0 gilt dann :

$$c_o^0 = c_o + c_k \quad \text{und} \quad c_p^0 = c_p + c_k$$

An Hand der Oligonukleotide E_1E_2 und E_5E_6 sollten nun die Affinitätsunterschiede der beiden NF I - Bindestellen ermittelt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die unmittelbar flankierenden Sequenzen der Bindestelle einen Einfluß auf die Bindestärke ausüben. Dazu wurden die Oligonukleotide E_3E_4 und E_7E_8 herangezogen.

Zur Durchführung der Versuche wurden steigende Mengen der radioaktiv markierten Oligonukleotide jeweils mit der gleichen Menge Rohextrakt aus Mäuseleberkernen inkubiert und die Ansätze auf 11 % igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Dabei war darauf zu achten, daß die Bedingungen (150 mM NaCl, 40 µl Gesamtvolumen) für jeden einzelnen Ansatz identisch waren. Das fixierte und getrocknete Gel wurde autoradiographiert. Die Konzentrationen der entstandenen Komplexe konnten durch Quantifizierung der Komplexbanden ermittelt werden. Dazu wurde, wie unter 3.10.4. beschrieben, die jeder Komplexbande entsprechende Menge an Radioaktivität sowohl im Scanner als auch im Szintillationszähler bestimmt. Diese doppelte Auswertung diente als interne Kontrolle für die Genauigkeit der Versuchsdurchführung. Die Konzentration der Komplexe wurde dann nach Gleichung (4) berechnet.

$$(4) \quad c_k = \frac{\text{cpm}_k}{A^* \times \text{Vol} \times 10^{-9}} \quad \frac{(\text{Mol})}{(l)}$$

cpm_k : gemessene cpm der ausgewerteten Komplexbande

A^* : spezifische Aktivität des eingesetzten Oligonukleotids

Vol : Reaktionsvolumen

Die spezifische Aktivität der Oligonukleotide wurde durch TCA - Fällung eines Aliquots der markierten DNA bestimmt.

Nach Gleichung (2a) können nun theoretisch die K - Werte für die einzelnen Oligonukleotide berechnet werden, vorausgesetzt man kennt c_p^0 , die Ausgangskonzentration von NF I. Da sich jedoch die exakte Bestimmung des Anteils von NF I im Rohextrakt als problematisch erwies und für die Klärung der Fragestellung in erster Linie die relativen Affinitätsunterschiede von Bedeutung waren, wurde Gleichung (2a) in die lineare Gleichung (2b) umgeformt :

$$(2b) \quad \frac{1}{c_o} = K c_p^0 \times \frac{1}{c_k} - K$$

Diese Gleichung ermöglicht die graphische Darstellung der Meßwerte. Trägt man die reziproken Werte $1/c_o$ und $1/c_k$ in einem Diagramm gegeneinander auf, erhält man eine Gerade, deren Steigung proportional dem K - Wert ist. Unterschiedliche Affinitäten von NF an die vier Oligonukleotide sollten sich also in der Steigung der jeweiligen Gerade widerspiegeln.

In Abbildung 4.11. sind die Autoradiogramme von Gelen dargestellt, die zur Ermittlung der Affinitätsunterschiede der vier untersuchten Oligonukleotide ausgewertet wurden. Die Berechnung von c_k und c_o und der jeweiligen reziproken Werte ist exemplarisch für E_1E_2 in Tabelle 4.1. dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
cpm	14080	17726	22118	26494	33305	41557	71774	105223	101780
f_{mol} E_1E_2	4.45	5.94	7.425	8.91	11.88	14.85	29.7	44.5	59.4
$c_o/10^{-9}$	0.11	0.148	0.185	0.22	0.297	0.37	0.7425	1.11	1.485
$c_k/10^{-9}$	0.046	0.058	0.073	0.087	0.109	0.137	0.236	0.346	0.33
$1/c_k \times 10^{-9}$	21.7	17.2	13.7	11.5	9.2	7.3	4.2	2.9	3.0
$c_o/10^{-9}$	0.064	0.09	0.112	0.133	0.188	0.233	0.506	0.764	1.11
$1/c_o \times 10^{-9}$	15.6	11.1	8.9	7.52	5.32	4.3	1.97	1.31	0.87

Tabelle 4.1.:

Berechnung von c_o und c_k aus einem ausgewerteten Gelretentionstest
Die Werte für cpm wurden durch Messen der Radioaktivität in den Komplexbanden im Szintillationszähler ermittelt

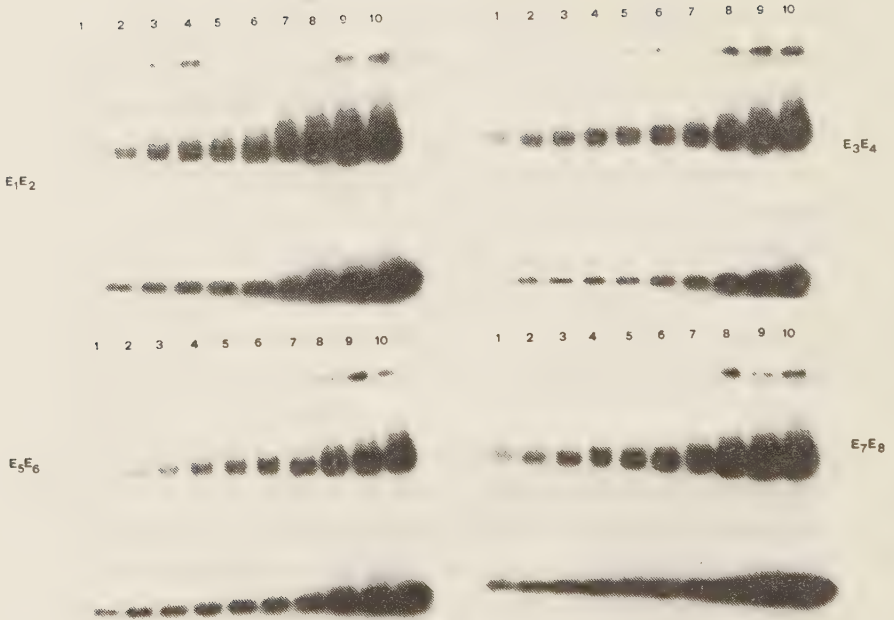


Abb. 4.11.

Bestimmung der Affinitätsunterschiede von NF I an Oligonukleotide

1: 1 μ l DNA 2: 1.5 μ l 3: 2 μ l 4: 2.5 μ l 5: 3 μ l

6: 4 μ l 7: 5 μ l 8: 10 μ l 9: 15 μ l 10: 20 μ l.

Die Mengen für E_1E_2 in fmol sind der Tabelle zu entnehmen. Allen Proben wurde 500ng dIdC zugesetzt und die Ansätze mit 5 μ l Rohextrakt (2 μ g Protein) 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Für alle vier Gele galten die selben Versuchsbedingungen.

Die Versuche wurden mehrmals durchgeführt und die jedem Oligonukleotid entsprechende Gerade gemittelt. Um sicherzustellen, daß die eingesetzte Proteinkonzentration für alle vier Oligonukleotide gleich war, wurden die vier Versuche jeweils am gleichen Tag und mit dem selben Extrakt ausgeführt.

Abbildung 4.12. zeigt die Graphik für vier ausgewertete Gele. Idealerweise sollten sich die korrespondierenden K - Werte direkt aus dem Abschnitt der y - Achse ablesen lassen. Auf Grund der Streuung der einzelnen Meßwerte war jedoch der aus der Regressionsgeraden abgelesene Wert zu ungenau.

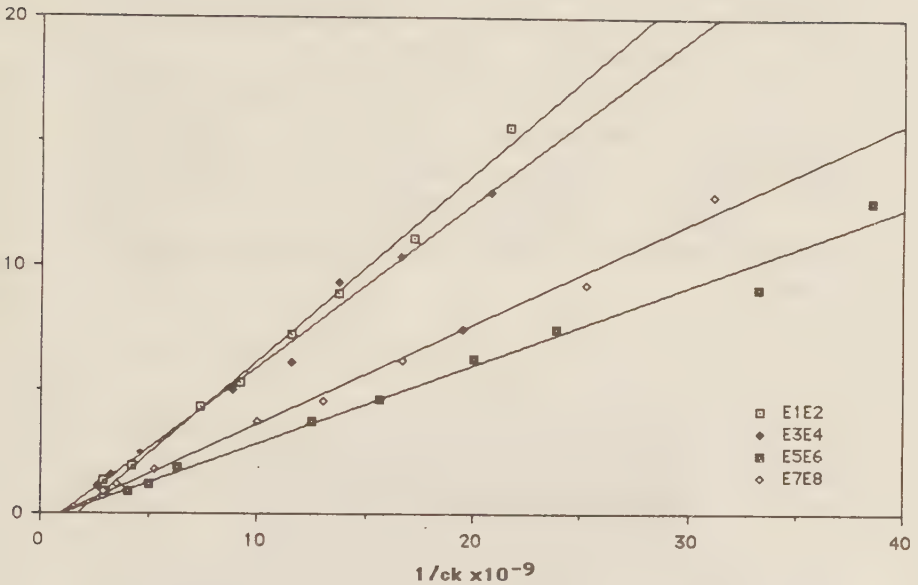


Abb 4.12.:

Graphische Darstellung der im Gelretentionstest ermittelten Affinitätsunterschiede

Es ergab sich folgendes Bild für die Affinität von NF I an die Oligonukleotide :

$$E_1E_2 \geq E_3E_4 > E_7E_8 > E_5E_6$$

Trotz der oben erwähnten Schwierigkeiten war versucht worden, die Werte für die Bindekonstanten zu berechnen. Um c_p^0 zu bestimmen, wurde ein Kompetitionsversuch durchgeführt, bei dem das radioaktive Oligonukleotid E_1E_2 mit steigenden Mengen unmarkiertem E_1E_2 unter den üblichen Bindungstestbedingungen so lange kompetitiert wurde, bis der Anteil des markierten E_1E_2 am Komplex praktisch vernachlässigbar wurde. Die Ansätze wurden auf einem

11 % igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel wie oben beschrieben ausgewertet. Nach Gleichung (4) konnte dann für jeden Meßwert die Konzentration des Komplexes berechnet werden.

Da bei Einsatz eines genügend hohen Überschusses an Oligonukleotid davon ausgegangen werden kann, daß der gesamte Anteil von NF I in der eingesetzten Rohextraktmenge als Komplex vorliegt, entspricht die Komplexkonzentration dann in etwa der NF I - Ausgangskonzentration c_p^0 .

Das Autoradiogramm eines Proteinbestimmungsgels ist in Abbildung 4.13. gezeigt.

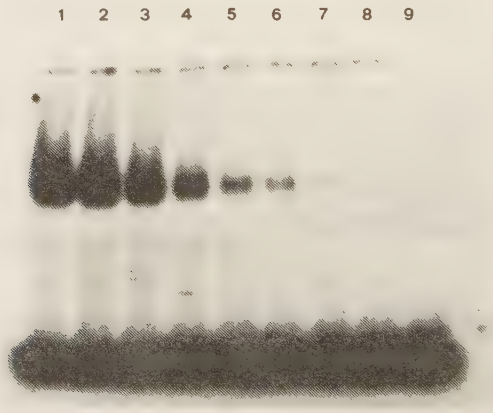


Abb. 4.13.

Gel zur Bestimmung von c_p^0

10 μ l (29.7 fmol) radioaktiv markiertes E_1E_2 wurde in Gegenwart von 500 ng dIdC und 5 μ l Rohextrakt mit steigenden Mengen unmarkiertem E_1E_2 kompetitiert.

1: ohne Kompetitor 2: 50 fmol E_1E_2 3: 100 fmol 4: 200 fmol
5: 500 fmol 6: 750 fmol 7: 1000 fmol 8: 2000 fmol 9: 5000 fmol

Die Auswertung dieses Gels ist in Tabelle 4.2. schematisch dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
cpm	81787	55613	36490	21431	9823	8680	6538	4029	1987
f _{mol} E ₁ E ₂ *	29.7	—	—	—	—	—	—	—	—
f _{mol} E ₁ E ₂	—	50	100	200	500	750	1000	2000	5000
spez. Akt.	7608	2835	1742	983	426	289	219	111	44.9
f _{mol} k	10.7	19.6	20.9	21.7	23	30	29.8	36.3	44.2
c _k x 10 ⁻⁹	0.27	0.49	0.52	0.54	0.57	0.75	0.75	0.9	1.1

Tabelle 4.2.:

Auswertung des Proteinbestimmungsgels zur Berechnung von c_p^0

Es wurde angenommen, daß ein c_k - Wert von 1×10^{-9} , der für den Einsatz von mehr als 2 pmol Oligonukleotid berechnet worden war, in etwa der eingesetzten Konzentration an NF I entspricht. Dieser Wert wurde für die Ermittlung der K - Werte herangezogen.

Die auf diese Weise nach Gleichung (2a) berechneten K - Werte bestätigen die graphisch ermittelten Affinitätsunterschiede von NF I an die Oligonukleotide. Sie sind jedoch nicht als Absolutwerte für Bindekonstanten zu betrachten, da auf Grund der Verwendung von Rohextrakten unspezifische Wechselwirkungen anderer Proteine mit den Oligonukleotiden nicht ausgeschlossen werden konnten (s. Diskussion).

Die folgenden Mittelwerte wurden für die vier Oligonukleotide berechnet :

$$E_1E_2 \approx 6 \times 10^8 \text{ l/Mol}$$

$$E_3E_4 \approx 5.5 \times 10^8 \text{ l/Mol}$$

$$E_5E_6 \approx 2.9 \times 10^8 \text{ l/Mol}$$

$$E_7E_8 \approx 3.5 \times 10^8 \text{ l/Mol}$$

Wie erwartet, zeigte das Oligonukleotid E_1E_2 die stärkste Bindung mit NF I. An E_5E_6 , das die Sequenz der Bindestelle innerhalb der terminalen Repetition trägt, hatte NF I eine um den Faktor 2 - 3 geringere Affinität. Das Oligonukleotid E_3E_4 , bei dem die Umgebung der Erkennungssequenz von E_1E_2 gegen die von E_5E_6 ausgetauscht worden war, wies praktisch keinen

Unterschied in der Bindung zu E_1E_2 auf E_7E_8 , bei dem die Spiegelsymmetrie über die Erkennungssequenz von E_1E_2 hinaus fortgeführt ist, hatte im Vergleich zu E_1E_2 eine um etwa 50 % reduzierte Affinität zu NF I.

4.5. Nachweis der Bindung von NF I an längere DNA - Fragmente aus AdFL

Der Einsatz von Oligonukleotiden im Gelretentionstest ist nicht zum Nachweis von Proteinen geeignet, die DNA - Sekundärstrukturen erkennen, da sich diese auf Grund fehlender flankierender Sequenzen nicht ausbilden können. Die Bindung an Oligonukleotide beruht also auf der Erkennung der durch die Sequenz festgelegten Primärstruktur.

Um zu prüfen, ob eine Ausbildung von Sekundärstrukturen einen Einfluß auf das Bindungsverhalten von NF I hat, sollten längere DNA - Fragmente in den Versuch eingesetzt werden.

4.5.1. Isolierung und Klonierung von DNA - Fragmenten mit NF I - Bindestellen

Geeignete Fragmente, die je eine der beiden im rechten Ende von AdFL vorkommenden Bindestellen enthalten, wurden aus dem Klon 8317 (s. 4.2.2.2.) isoliert.

Die Plasmid - DNA wurde mit den Restriktionsenzymen Eco R I und Sma I, bzw. Sma I und Hind III in einem Doppelverdau gespalten und auf einem präparativen niedrig schmelzenden Agarosegel aufgetrennt. Die resultierenden Sma I / Eco R I - und Sma I / Hind III - Fragmente wurden wie beschrieben aus dem Gel isoliert.

Um die beiden Fragmente in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, wurde die gereinigte DNA in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids pUC12 kloniert. Dazu wurde die Plasmid - DNA ebenfalls sowohl mit Sma I und Eco R I als auch mit Sma I und Hind III gespalten, die entstehenden Fragmente über ein Agarosegel gereinigt und nach der Phosphatasebehandlung mit den AdFL - Fragmenten ligiert. Mit den Ligaseansätzen wurde der

kompetente Bakterienstamm JM 83 transformiert und rekombinante Klone auf Agarplatten, die Ampicillin und X - Gal enthielten, selektioniert.

Durch Restriktionsspaltung von DNA, die über Schnellaufschlüsse isoliert worden war, wurden die Klone auf das Vorhandensein des entsprechenden Fragments überprüft. Die beiden Plasmide wurden mit pSE (1. Bindestelle) und pSH (2. Bindestelle) bezeichnet.

Die gewünschten Fragmente wurden dann durch Restriktionsspaltung und anschließender präparativer Gelelektrophorese aus den Plasmiden gereinigt.

Für den Einsatz in den Gelretentionstest wurden die Fragmente mit Phosphatase behandelt und mit T4 - Kinase radioaktiv markiert. Da das Enzym Sma I glatte Schnittstellen erzeugt, die für eine Kinasereaktion schwerer zugänglich sind, es aber zugleich wünschenswert war, die Fragmente mit möglichst hoher spezifischer Aktivität zu markieren, wurde nach der Kinasierungsvorschrift für glatte Schnittstellen vorgegangen.

Durch TCA - Fällung eines Aliquots der markierten DNA wurde die spezifische Aktivität bestimmt. Allerdings erwies sich eine genaue Konzentrations - bestimmung der Fragmente als problematisch, da die Ausbeute bei der Isolierung von DNA aus dem Gel etwas schwankte und die erhaltene DNA - Menge in der Regel für eine photometrische Bestimmung zu gering war. Die Fragmentmenge wurde abgeschätzt, indem ein Teil davon auf ein Minigel aufgetragen wurde und die Intensität der Bande mit bekannten DNA - Konzentrationen verglichen wurde.

4.5.2. Charakterisierung der DNA - Proteinkomplexe im Gelretentionstest

Um die Proteinbindungseigenschaften der Fragmente und der Oligonukleotide miteinander vergleichen zu können, wurden Bindungstests mit Rohextrakt aus Mäuseleberkernen durchgeführt. Dazu wurden die radioaktiv markierten Fragmente und das Oligonukleotid E₁E₂ mit der entsprechenden Menge Rohextrakt inkubiert und die entstehenden DNA - Proteinkomplexe auf einem 5 - 15 % igen nativen Gradientengel aufgetrennt.



Abb. 4.14.

Vergleich der Bindungseigenschaften von NF I mit Fragmenten und Oligonukleotiden

1: Sma I/Eco RI - Fragment

2: Sma I/Hind III - Fragment

3: E₁E₂

Es wurden jeweils ca. 10 fmol DNA mit 5 µl Rohextrakt in Gegenwart von 500 ng dIdC inkubiert und auf ein 5 - 15 % natives PAA - Gel aufgetragen.

Das Autoradiogramm dieses Gels (Abb. 4.14.) zeigt, daß bei Einsatz von längeren DNA - Fragmenten als Liganden, im Gegensatz zu dem 40 bp großen Oligonukleotid, mehrere Komplexbanden auftraten. Diese zusätzlichen Banden könnten entweder durch Bindung von im Rohextrakt enthaltenen Proteinen an Bereiche außerhalb der Erkennungssquenz oder auf Grund der Bindung oligomerer Formen von NF I zustande kommen, wozu längere flankierende Sequenzen als bei Oligonukleotiden erforderlich sein könnten. Es ist bisher nicht bekannt, ob NF I in monomerer, dimerer oder sogar in tetramerer Form an DNA bindet.

Um diese beiden Möglichkeiten zu prüfen, wurden Wettbewerbsversuche durchgeführt. Im Falle der Bindung eines von NF I verschiedenen Proteins, egal ob diese spezifisch oder unspezifisch ist, sollten sich, im Gegensatz zur zweiten Hypothese, die auftretenden Banden mit der homologen DNA nicht kompetitieren lassen.

Es wurden jeweils ca. 10 fmol des markierten Fragments in Gegenwart von 500 ng dIdC mit der 10 - fachen, 100 - fachen und 500 - fachen Menge an unmarkiertem E₁E₂, bzw. myc₅myc₆, sowie mit der 10 - fachen und 100 - fachen Menge an unmarkiertem Fragment versetzt, mit 2 µg Protein aus dem Rohextrakt in Bindepuffer inkubiert und auf 5 % igen (für das 220 bp SH - Fragment) bzw. 8 % igen (für das 95 bp SE - Fragment) nativen Polyacryl - amidgelen aufgetrennt.

Wie aus den Abbildungen 4.15. a, b und c. deutlich wird, nimmt die Intensität aller auftretenden Komplexbanden bei homologer Konkurrenz ab, während die Konkurrenz mit dem Kontrolloligonukleotid keine Änderung im Bandenmuster verursacht. Damit kann die Bindung von anderen Proteinen an die flankierenden Bereiche der NF I - Bindestellen weitgehend ausgeschlossen werden.

Die spezifische Bindung von Proteinen an rotationssymmetrische DNA - Sequenzen ist ein typisches Merkmal für DNA - Protein - Wechselwirkungen in Prokaryoten und ist z.B. für die Bindung von Repressor und Aktivator an Operatoren im lac - System beschrieben worden (Takeda et al., 1983). Derartige zweifach symmetrische DNA - Sequenzen erlauben die Bindung von Protein - Dimeren oder - Tetrameren an DNA - Doppelstränge. Die Struktur der NF I - Bindestellen legt einen ähnlichen Bindungsmechanismus nahe. Die Bindung mehrerer Moleküle NF I an ein DNA - Molekül würde auch das Bandenmuster in Abbildung 4.15. erklären.

Binden unterschiedlich viele NF I - Moleküle an jeweils ein DNA - Molekül, so treten im Gel auf Grund der verschiedenen Molekulargewichte der Komplexe mehrere Banden auf. Die am schnellsten wandernde Bande könnte dann einem monomeren DNA - Proteinkomplex entsprechen.

Im Konkurrenzversuch wurde das radioaktive Fragment mit unmarkierter DNA verdünnt, so daß sich die im Extrakt vorhandenen NF I - Moleküle auf eine größere Anzahl von Bindestellen verteilen müssen. Das führt dazu, daß, je mehr unmarkierte DNA - Moleküle eingesetzt werden, bei gleichbleibender Proteinkonzentration an die einzelnen DNA - Fragmente weniger NF I - Moleküle binden.

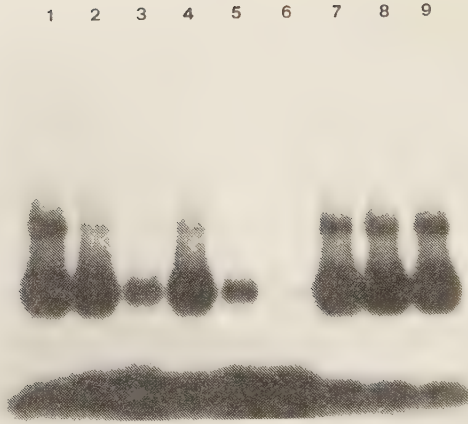


Abb. 4.15.a) Kompetition des Sma I / Eco RI - Fragments

1: S/E - Fragment * (10 fmol) 2: + 100 fmol S/E 3: + 500 fmol S/E
 4: + 100 fmol E₁E₂ 5: + 500 fmol E₁E₂ 6: + 1000 fmol E₁E₂
 7: + 100 fmol myc_{5/6} 8: + 500 fmol myc_{5/6} 9: + 1000 fmol myc_{5/6}

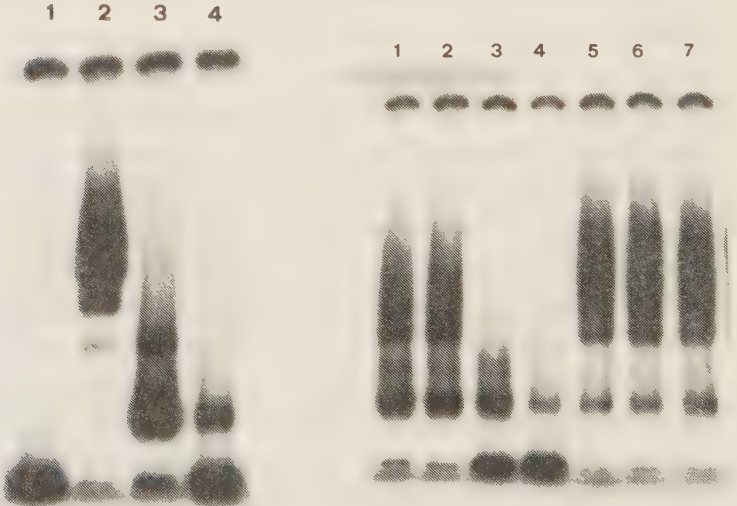


Abb. 4.15. Kompetition des Sma I / Hind III - Fragments

b) 1: S/H * ohne Protein 2: S/H*
 3: + 100 fmol S/H 4: + 500 fmol S/H
 c) 1: S/H* 2: + 100 fmol E₁E₂
 3: + 500 fmol E₁E₂
 4: + 1000 fmol E₁E₂
 5 - 8: wie 2 - 4, aber + myc_{5/6}

Das Bandenmuster in Abb. 4.15. spiegelt diesen Effekt wieder. Die Bandenintensität der höhermolekularen Komplexe nimmt zuerst ab, während die Banden der Komplexe mit dem niedrigsten Molekulargewicht erst bei Konkurrenz mit dem 500 - fachen Überschuß homologer DNA deutlich schwächer werden.

4.6. Einfluß der flankierenden Sequenzen auf die Bindung von NF I

Das Auftreten von mehreren Banden im Gelretentionstest bei der Verwendung längerer DNA - Fragmente deutete auf einen Einfluß der die Erkennungssequenz umgebenden Bereiche hin. Spielt die Sequenz dieser flankierenden Bereiche eine Rolle für die Bindung des Proteins oder ist die Gegenwart superhelicaler DNA - unabhängig von ihrer Sequenz - ausreichend ?

Diese Frage sollte geklärt werden können, wenn man die flankierenden Bereiche von AdFL gegen eine beliebige andere DNA austauscht und dann deren Bindungsverhalten untersucht.

4.6.1. Klonierung des Oligonukleotids E_1E_2 in pUC8

Für die Durchführung des Versuchs wurde das Oligonukleotid E_1E_2 in die Polylinkerregion von pUC8 kloniert, wodurch die Bindestelle für NF I in die Umgebung von pUC8 - DNA zu liegen kam.

Dazu wurde pUC8 - DNA mit Bam H I und Eco R I gespalten, das dabei entstehende ca. 2700 bp große Fragment wurde über niedrig schmelzende Agarose gereinigt. Da E_1E_2 bei der Synthese am 5' - Ende mit einer Eco R I - Schnittstelle und am 3' - Ende mit einer Bam H I - Stelle versehen worden war, konnten der dephosphorylierte Vektor und das Oligonukleotid direkt mittels T4 - Ligase verknüpft werden. Damit wurde der kompetente Bakterienstamm DH1 nach der Methode von Hanahan (1983) transformiert und auf Ampicillin - resistenz selektioniert.

Die erhaltenen Klone wurden durch Koloniehybridisierung mit markierter E_1E_2 -DNA auf das Vorhandensein des Inserts untersucht. Da die Möglichkeit

bestand, daß ein Vektormolekül mehrere Kopien des Oligonukleotids enthielt, wurden einige positive Klone durch Restriktionsspaltung der aus Schnell-aufschlüssen gewonnenen DNA charakterisiert. Zusätzlich wurden zwei Klone nach der modifizierten Didesoxy - Methode (s. 3.10.7.) unter Verwendung des reversen Primers von der Eco R I - Stelle ausgehend ansequenziert und mit der bekannten Sequenz des Oligonukleotids verglichen. In Abbildung 4.16. ist das Klonierungsschema dargestellt.

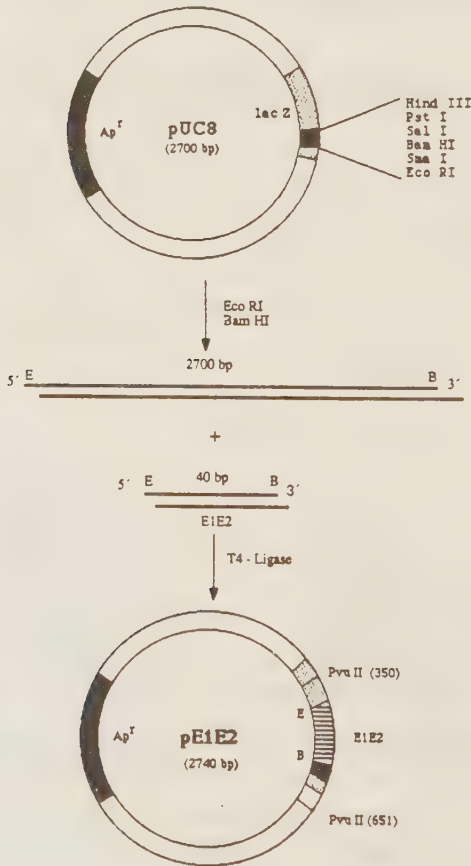


Abb.4.16.:

Klonierung von E₁E₂ in pUC8

4.6.2. Vergleich der Bindung von NF I an DNA - Fragmente mit originaler und veränderter Umgebung im Gelretentionstest

Um ein für den Einsatz im Bindungstest geeignetes Fragment zu erhalten, wurde pE₁E₂ mit Pvu II gespalten. pUC8 enthält zwei Schnittstellen für Pvu II, eine bei Position 350, die andere bei Position 651, wobei das kleinere Fragment die Insertion des Oligonukleotids trägt. Dieses 339 bp große Fragment wurde aus einem präparativen niedrig schmelzenden Agarosegel isoliert. Es wurde dann durch Phosphatasebehandlung und anschließende 5'-Markierung für die Verwendung im Bindungstest vorbereitet. Da Pvu II glatte Schnittstellen erzeugt, wurde für die Markierung nach der Vorschrift für glatte Enden vorgegangen. Die spezifische Aktivität der Fragmente wurde durch TCA - Fällung bestimmt, wobei auch hier wieder, wie schon unter 4.5.2. beschrieben wurde, berücksichtigt werden muß, daß die Konzentrationsangaben für die Fragmente auf Schätzungen beruhen.

Im Gelretentionstest wurden dann die Bindungseigenschaften des Sma I / Hind III - Fragments aus AdFL und des Pvu II - Fragments aus pE₁E₂ miteinander verglichen.

Es wurden in etwa gleiche Mengen der markierten Fragmente (≈ 10 fmol) in den Bindungstest eingesetzt. Die Auftrennung der Produkte erfolgte auf 7 % igen nativen Polyacrylamidgelen.

Ein erstes Gel zeigte bereits das etwas überraschende Ergebnis, daß das Pvu II - Fragment aus pE₁E₂ im Komplex mit NF I nicht die für das AdFL - Fragment typische Bandenleiter ergab, sondern daß maximal zwei Komplexbanden im Gel auftraten. Durch Kompetitionsversuche mit E₁E₂ und myc₅myc₆ als Kompetitoren (Abb. 4.17.) wurde die Spezifität dieser Banden nachgewiesen. Da beide verwendeten DNA - Fragmente über die selbe NF I - Bindestelle verfügten, könnte das Fehlen von höhermolekularen Komplexbanden in den pE₁E₂ - Fragmenten an der veränderten Umgebung der Bindestelle liegen. Möglicherweise bildet das pE₁E₂ - Fragment eine Sekundärstruktur aus, die eine Bindung mehrerer Moleküle von NF I nicht mehr zuläßt.

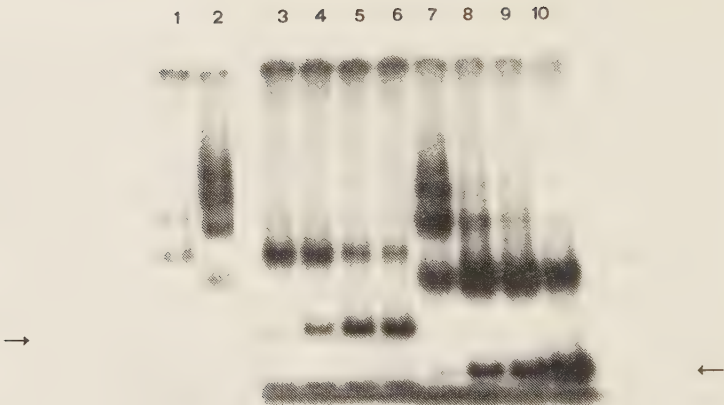


Abb. 4.17.

Vergleich der Fragmente im Kompetitionstest

1: Pvu II - Fragment aus pE₁E₂ ohne Kompetitor - DNA

2: Sma I/Hind III - Fragment aus AdFL ohne Kompetitor - DNA

3: wie 1 4: +100 fmol E₁E₂ 5: +500 fmol E₁E₂ 6: +1000 fmol E₁E₂

7: wie 2 8: +100 fmol E₁E₂ 9: +500 fmol E₁E₂ 10: +1000 fmol E₁E₂

Pfeile geben die Position der freien Fragmente an.

4.7. Vorkommen von NF I in verschiedenen Geweben der Maus

Alle bisher beschriebenen Experimente zum DNA - bindenden Verhalten von NF I waren zum größten Teil mit Kernextrakten aus Mäuselebern durchgeführt worden. Um zu testen, ob die selbe DNA - bindende Aktivität auch in anderen Zelltypen der Maus vorkommt, wurden Kernextrakte aus verschiedenen Geweben hergestellt. Dabei wurde nach der gleichen Vorschrift wie für Leberkernextrakte vorgegangen (s. 3.2.2.). Abbildung 4.18. zeigt eine Analyse dieser Extrakte in denaturierenden SDS - Harnstoff - Poly - acrylamidgelen (s.3.5.)

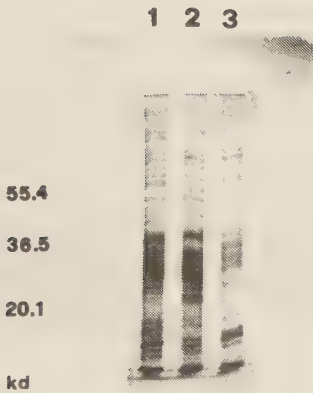


Abb. 4.18.

Analyse der Extrakte in einem denaturierenden 5 - 15 % PAA-Gel

1: Leberkernextrakt

2: Hirnkernextrakt

3: Milzkernextrakt

Es wurden je 2 μ g Protein aus Rohextrakt eingesetzt.

Die Zahlen geben die Größen von Vergleichsproteinen an.

Vergleichbare Mengen von Kernextrakt aus Leber, Hirn und Milz wurden mit dem Oligonukleotid E_1E_2 in Bindepuffer inkubiert und die Ansätze im Gelretentionstest analysiert. Um eine Quantifizierung des Gehalts von NF I in den verschiedenen Extrakten vornehmen zu können, wurde die Bindestelle mit steigenden Mengen an unmarkiertem E_1E_2 kompetitiert. Der unterschiedliche Verlauf der Intensitätsabnahme der Komplexbanden im Autoradiogramm (Abb. 4.19.) spiegelt dann die relative Menge an NF I in den verwendeten Extrakten wieder.

Wie aus dem Autoradiogramm ersichtlich ist, kommt in allen drei Extrakten ein DNA - bindendes Protein mit NF I - Spezifität vor. Während die Menge an NF I im Leber - und Hirnextrakt in etwa vergleichbar ist, enthält der Milzextrakt deutlich weniger NF I.

Die Quantifizierung der Komplexbanden im Scanner (Tab. 4.3.) ergab einen um den Faktor fünf bis zehn geringeren NF I - Gehalt im Milzextrakt als in Leber- und Hirnextrakten.

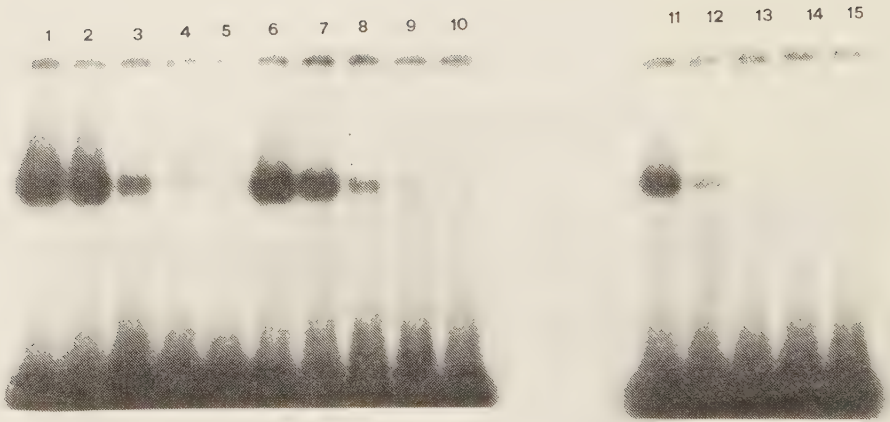


Abb. 4.19.

Vergleich der Menge an NF I in verschiedenen Geweben durch
Kompetitionstest

1-5: Leberkernextrakt

6-10: Hirnkernextrakt je 2 µg Protein aus Rohextrakt

11-15: Milzkernextrakt

Es wurden jeweils 10 fmol markiertes E_1E_2 eingesetzt und mit 100, 500, 1000 und 5000 fmol E_1E_2 kompetitiert.

cpm	Leber		Hirn		Milz
1	18185	6	16060	11	4096
2	14719	7	7138	12	1006
3	2512	8	1294	13	303
4	647	9	637	14	412
5	613	10	499	15	327

Tabelle 4.3.

Auswertung des Kompetitionsassays

Angegeben ist die Menge der in den Komplexbanden gemessenen Radioaktivität in cpm

4.8. Einfluß von ATP auf die Bindung von NF I an AdFL - DNA

Die DNA - Bindungseigenschaften einiger pro - und eukaryotischer Proteine, die an DNA - Replikations - und Rekombinationsvorgängen beteiligt sind, werden durch die Bindung von Nukleotiden beeinflusst. So wird zum Beispiel die Bindung des dnaB - Proteins aus *E. coli* an einzelsträngige DNA durch ATP und andere Ribonukleosidtriphosphate allosterisch aktiviert (Arai und Kornberg, 1981). Auch für die sequenzspezifische Bindung der Tn3 - Transposase an die umgekehrten Repetitionen des Transposons wird ATP benötigt (Wishart et al., 1985). Dagegen wird die HeLa - Topoisomerase I - Aktivität bereits von geringen Mengen ATP gehemmt (Low und Holden, 1985).

Vor kurzem wurde außerdem gezeigt, daß die spezifische Bindung des großen T - Antigens des SV40 - Virus an zwei bestimmte Sequenzen innerhalb der Kontrollregion der viralen DNA durch Zugabe von niedrigen Konzentrationen ATP und GTP stark inhibiert wird (Vogt, 1986).

Es sollte daher untersucht werden, ob die DNA - bindenden Eigenschaften von NF I, einem Protein, das die Replikation von Adenovirus - DNA stimuliert, in irgendeiner Weise durch die Gegenwart von ATP moduliert werden.

Dazu wurden Bindungstests mit E₁E₂ und Leberkernextrakt durchgeführt und die einzelnen Ansätze mit unterschiedlichen Mengen ATP inkubiert.

Unter den angewandten Versuchsbedingungen konnte weder ein stimulierender noch ein inhibierender Einfluß von ATP auf die Bindung festgestellt werden (Abb. 4.20.).

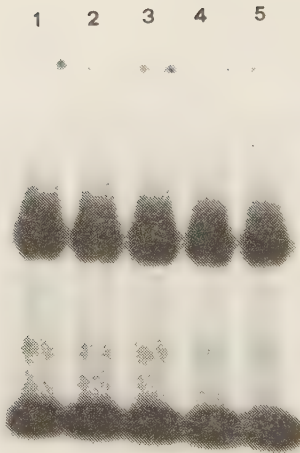


Abb. 4.20.

Einfluß von ATP auf die Bindung von NF I

1: 10 fmol E_1E_2 ohne ATP

2: +0.5 mM ATP

3: +1 mM ATP

4: +5 mM ATP

5: +10 mM ATP

Alle Ansätze wurden mit 5 μ l Roh-extrakt und 500 ng dIdC inkubiert

5. DISKUSSION

5.1. NF I - Bindestellen im Genom des Mausadenovirus AdFL

Die ähnliche Struktur der Enden von menschlichen Adenoviren und dem Mausadenovirus Serotyp AdFL legte einen gemeinsamen Mechanismus für die DNA - Replikation nahe. Von Temple und Mitarbeitern konnte ein identisches Replikationsmuster für beide Viren nachgewiesen werden (Temple et al., 1981). Deshalb sollten auch Bindestellen für das DNA - bindende zelluläre Protein Nuklearfaktor I, das für die Replikation der menschlichen Adenoviren essentiell ist, in der umgekehrten terminalen Repetition von AdFL zu finden sein. In der Tat konnten durch Filterbindungstests und Footprintexperimente NF I - Bindestellen im Genom von AdFL nachgewiesen werden (s. 4.2.). Eine Bindestelle liegt wie bei den menschlichen Adenoviren innerhalb des ITR. Erstaunlicherweise identifizierten wir jedoch im rechten Ende der AdFL - DNA, 30 bp außerhalb der Repetition, einen weiteren Bereich, an den NF I mit hoher Affinität bindet. In der entsprechenden Region von Ad2 und Ad5 fehlt diese Bindestelle. Da die Sequenzen der beiden Bindestellen von AdFL einige Unterschiede aufweisen und sie zudem in völlig voneinander abweichenden Umgebungen liegen, wurden sie als Modellsystem zur Untersuchung einiger Bindungseigenschaften von NF I herangezogen.

5.2. Affinität von NF I an die Bindestellen im rechten Ende des AdFL - Genoms

Bereits die Identifizierung der beiden NF I - Bindestellen im rechten Ende der AdFL - DNA lieferte erste Hinweise auf eine unterschiedliche Affinität. So konnte im DNase - Footprint nur die Bindestelle außerhalb des ITR nachgewiesen werden. Erst der empfindlichere Test mit Exonuklease III bewies, daß das Protein an beide Erkennungssequenzen bindet.

Zur Bestimmung der Affinitätsunterschiede von NF I an die beiden Bindestellen wurden verschiedene Methoden angewendet. Im Filterbindungstest (s.4.4.1.) konnte eine deutlich höhere Affinität von NF I an die Bindestelle außerhalb des

ITR nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Gelretentionstest, der eine Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen DNA - Protein - komplexen auf Grund des auftretenden Bandenmusters ermöglicht, werden im Filterbindungstest alle im Extrakt enthaltenen Proteine nachgewiesen, die an die radioaktiv markierte DNA binden. Deshalb wurde zur quantitativen Ermittlung der Affinitätsunterschiede die Technik des Gelretentionstests angewendet (s.4.4.2.).

Die Versuche wurden mit den Oligonukleotiden E₁E₂ (NF I - Bindestelle außerhalb des ITR von AdFL), E₅E₆ (Bindestelle innerhalb des ITR), E₃E₄ (Erkennungssequenz von E₁E₂ in der Umgebung der Bindestelle innerhalb des ITR) und E₇E₈ (vollständig symmetrisches Oligonukleotid mit der Erkennungssequenz von E₁E₂) durchgeführt (s. Abb. 4.9.).

Die auf diese Weise ermittelten Affinitätsunterschiede bestätigten, daß NF I in vitro am stärksten an das Oligonukleotid E₁E₂ bindet. Im Vergleich zu E₅E₆ ist die Affinität von NF I an E₁E₂ etwa um den Faktor zwei bis drei höher. Betrachtet man die Sequenz dieser Bindestelle, so fällt auf, daß die Erkennungssequenz eine komplette Spiegelsymmetrie aufweist. Neben der Anzahl der Nukleotide, die zwischen dem TGG und GCCAA Motiv der Bindestelle liegen, scheint auch die Sequenz des Spacers von Bedeutung für die Bindung zu sein. Das zeigen z.B. die Sequenz TGGGCGGCGGCCAA im Plasmid pBR 322 (Gronostajski et al., 1985) oder die Sequenz TGGCAACTTGCCAA in einem mittelrepetitiven Element von Maus - DNA (Dubnick et al., 1983), an die NF I nicht bindet. Hennighausen und Mitarbeiter, die die Bindung von NF I an Elemente der Promoterregion des IE1 - Gens des Cytomegalovirus untersucht haben, stellten fest, daß eine synthetische Bindestelle mit kompletter Spiegelsymmetrie eine höhere Affinität für NF I aufwies, als die Originalbindestelle im IE1 - Gen (Hennighausen und Fleckenstein, 1986). Die Bindestelle außerhalb der terminalen Repetition von AdFL ist bisher die einzige identifizierte natürlich vorkommende NF I - Bindestelle, die vollkommen symmetrisch ist.

Die Rolle der unmittelbar flankierenden Regionen der Erkennungssequenz, zu deren Untersuchung die Oligonukleotide E₃E₄ und E₇E₈ dienten, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Zum einen scheint es von geringer Bedeutung zu

sein, wenn die flankierenden Regionen der untersuchten Bindestellen gegeneinander ausgetauscht werden, da sich die Bindungsaffinitäten für E_1E_2 und E_3E_4 kaum unterscheiden. Zum anderen aber deutet die schwächere Bindung von NF I an E_7E_8 auf einen Einfluß der umgebenden Sequenz hin. Bei diesem synthetischen Oligonukleotid ist die Spiegelsymmetrie der Erkennungssequenz von E_1E_2 in die flankierenden Bereiche hinaus fortgeführt, so daß ein vollständig rotationssymmetrisches Oligonukleotid vorlag. Ob diese ausgeprägte Symmetrie in einem 40 bp langen Oligonukleotid zur Ausbildung einer Sekundärstruktur führt, die die Bindung des Proteins sterisch behindern könnte, ist nicht bekannt. Zugleich befinden sich in diesem Oligonukleotid zu beiden Seiten der Erkennungssequenz mehrere dGdC - Basenpaare, die eine Entwindung der DNA erschweren. Ein derartiger Mechanismus ist jedoch als Voraussetzung für die Bindung und mögliche Funktion von NF I postuliert worden (Leegwater et al., 1985).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Affinität von NF I offenbar mit der Symmetrie der Bindestelle steigt. Welchen tatsächlichen Einfluß die benachbarten Sequenzen auf die Bindung ausüben, bedarf zur endgültigen Klärung weiterer Untersuchungen.

Wie beschrieben, wurden auch die Zahlenwerte für die Bindungskonstanten der einzelnen Oligonukleotide berechnet. Zu unserer Überraschung lagen die so ermittelten K - Werte jedoch um etwa zwei Größenordnungen unter denen, die von anderen Arbeitsgruppen für die Bindung von NF I an Ad2 - DNA berechnet worden waren. So ermittelten Rawlins und Mitarbeiter (1984), sowie Rosenfeld und Kelly (1986) Dissoziationskonstanten im Bereich von 2×10^{-11} . Im Unterschied zu der in vorliegender Arbeit beschriebenen Methode, waren die Konzentrationsbestimmungen der DNA - Proteinkomplexe dort über Filterbindungstests durchgeführt worden. Dieser Effekt wird auch von Fried und Crothers (1984) beschrieben, deren ebenfalls im Gelretentionstest ermittelte Gleichgewichtskonstanten für die CAP / lac-Promoter - Interaktionen erheblich unter denen von Winter und von Hippel (1981) im Filterbindungstest bestimmten Werten lagen. Die Problematik des Filterbindungstests ist bereits beschrieben worden.

Einen Einfluß auf die Höhe der berechneten Bindekonstanten mag auch die Verwendung von Rohextrakten ausgeübt haben. Die darin enthaltenen zahlreichen von NF I verschiedenen Proteine könnten trotz Zugabe von dIdC unspezifisch und mit geringer Affinität an einen Anteil der eingesetzten Oligonukleotide gebunden und so das Gleichgewicht beeinflussen haben. Über ein mittlerweile zur Verfügung stehendes Affinitätssystem konnte der Nuklearfaktor in jüngster Zeit in sehr reiner Form gewonnen werden. Versuche, die mit diesem gereinigtem Protein durchgeführt wurden, zeigten, daß die Bindekonstanten für ein Oligonukleotid, das die NF I - Bindestelle aus Ad2 trägt, um den Faktor 5 - 10 über den mit Rohextrakten ermittelten Werten lagen (M. Meisterernst, pers. Mitteilung).

Für die Untersuchungen zur Affinität von NF I an die Bindestellen im AdFL - Genom waren synthetische, ca. 40 bp lange Oligonukleotide verwendet worden. Da sich im weiteren Verlauf der Arbeit herausstellte, daß längere DNA - Fragmente ein anderes Bindungsverhalten zeigten (s.4.5.), wäre es interessant gewesen, die Affinität von NF I an Fragmente und Oligonukleotide zu vergleichen. Eine Auswertung der Gele, bei denen als Liganden die 95 bp (1. Bindestelle) und 220 bp (2. Bindestelle) langen DNA - Fragmente und die entsprechenden Oligonukleotide E₁E₂ und E₅E₆ verwendet wurden, war jedoch auf Grund der unterschiedlichen Bandenmuster nach der beschriebenen Methode nicht möglich.

Offensichtlich spielen komplexere Bindungsverhältnisse, als sie mit Oligonukleotiden nachgewiesen werden können, eine Rolle bei der Bindung von NF I. Die Bindungsstärke von NF I scheint nicht nur vom Vorhandensein einer optimalen Erkennungssequenz, sondern zusätzlich von weiteren Parametern beeinflusst zu werden. So könnte die Ausbildung von verschiedenen Sekundärstrukturen der DNA die Bindung von NF I sowohl begünstigen als auch hemmen.

Die Verifizierung dieser Hypothese war im Rahmen dieser Arbeit und mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich. Einen ersten Hinweis auf die Richtigkeit dieser These sollte aber der Vergleich von DNA - Fragmenten und Oligonukleotiden im Filterbindungstest bringen - nach Möglichkeit unter der Verwendung von hochgereinigtem Protein.

Die in vorliegender Arbeit vorgestellten relativen Affinitätsunterschiede der beiden Bindestellen zeigen jedoch deutlich, daß im Falle der Mausadenovirus - DNA eine Bindestelle mit sehr hoher Affinität für NF I außerhalb der umgekehrten Repetition vorliegt. Die biologische Funktion dieser Bindestelle ist bisher unbekannt.

5.3. Vergleich der Bindung von NF I an Oligonukleotide und DNA - Fragmente

Wie bereits erwähnt, zeigten längere DNA - Fragmente im Gelretentionstest ein deutlich anderes Bindungsverhalten als Oligonukleotide. Der Einsatz von Oligonukleotiden in die Versuchsansätze lieferte stets eine einzige prominente DNA - Proteinkomplexbande. Wurden hingegen DNA - Fragmente aus AdFL verwendet, die die Bindestellen enthielten, so traten bis zu vier Banden auf. Dieser zunächst überraschende Effekt wurde durch Kompetitionsversuche mit homologer und heterologer DNA auf seine Spezifität hin untersucht. Dabei zeigte sich, daß sich die Komplexbanden mit einem Überschuß an unmarkierter homologer DNA kompetitieren ließen, wobei die höhermolekularen Komplexbanden schneller verschwanden als die im Gel weiter laufenden Banden von niedrigerem Molekulargewicht. Es handelt sich also offensichtlich um eine spezifische Bindung, bei der unterschiedlich viele NF I - Moleküle an die DNA binden.

Die Erkennungsstellen einiger prokaryotischer Repressor - und / oder Aktivator-Proteine wie CAP, λ - Repressor und cro - Protein haben große Ähnlichkeit mit der NF I - Konsensussequenz. Sie bestehen ebenfalls aus rotationssymmetrischen Sequenzen mit einem Abstand von 4 - 6 bp zwischen den symmetrischen Boxen. Kristallographische Untersuchungen und NMR - Spektroskopie lieferten detaillierte Informationen über die Struktur und das Bindungsverhalten dieser Proteine. Sie binden als Dimere oder Tetramere, wobei die symmetrischen DNA - Sequenzen jeweils von einem monomeren Molekül besetzt sind. Der DNA - bindende Teil der Proteine besteht aus zwei aufeinanderfolgenden α - Helices. Eine α - Helix paßt in die große Ausbuchtung der DNA - Helix und bildet dort sequenzspezifische Kontakte mit den funktionellen Gruppen der Erkennungsstelle aus, während die andere α -

Helix über der großen Ausbuchtung liegt und dort vermutlich Kontakte mit dem Phosphatrückgrat der DNA macht. (Takeda et al., 1983).

Die rotationssymmetrische Struktur der NF I - Bindestelle und das Auftreten von mehreren Bindungsstufen im Geltest, machen für NF I einen ähnlichen Bindungsmechanismus wahrscheinlich, wie er für die prokaryotischen Proteine beschrieben wurde. Da über das Protein selbst bisher keinerlei Daten vorliegen, bedarf es zur Bestätigung dieser Hypothese einer Strukturaufklärung von NF I. Methylierungsschutzexperimente mit Dimethylsulfat, die von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden, zeigten, daß NF I mit GC - Basenpaaren in den konservierten Blöcken der großen Ausbuchtung der DNA - Helix in Kontakt tritt (de Vries, unveröffentlichte Ergebnisse)

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, traten bei der Verwendung des Sma I / Hind III - Fragments aus AdFL maximal vier Komplexbanden im Gel auf. Zusammen mit der beobachteten stufenweisen Kompetition der Banden bei Zugabe von steigenden Mengen der homologen DNA, spricht dies für einen Bindungsmechanismus, bei dem NF I als Tetramer an die konservierten Boxen der Erkennungsstelle bindet. Der umgekehrte Versuch, durch Zugabe eines Proteinüberschusses die Bindestellen mit NF I zu sättigen und nur noch eine hochmolekulare Bindungsstufe zu erhalten, scheiterte daran, daß bei Einsatz hoher Proteinmengen das Gel überladen war und keine Auflösung der Komplexbanden erfolgte.

Da der beschriebene Effekt nur bei längeren DNA - Fragmenten, nicht jedoch bei Oligonukleotiden auftritt, scheinen für die Bindung von NF I flankierende Bereiche der Erkennungssequenz erforderlich zu sein.

Durch Klonieren des Oligonukleotids E_1E_2 in pUC8 - DNA sollte untersucht werden, ob die Sequenz der flankierenden DNA für die Bindung eine Rolle spielt. Tatsächlich traten auch bei Einsatz der pE_1E_2 - Fragmente mehr Komplexbanden im Gel auf, als bei Verwendung der Oligonukleotide, aber weniger als mit den Original AdFL - Fragmenten. Es ist nicht anzunehmen, daß NF I mit einer bestimmten Sequenzfolge relativ weit außerhalb der Erkennungsstelle in direkten Kontakt tritt, da im DNase - Footprint nur ein 25 bp großer Bereich durch das Protein geschützt wird. Dagegen spricht auch das Vorkommen der Bindestelle in den verschiedensten DNA - Bereichen. Das

Auftreten unterschiedlich vieler Komplexbanden in Abhängigkeit der die Bindestelle umgebenden Region könnte aber zum Beispiel auf stereochemischen Änderungen der DNA - Struktur beruhen.

Bisher liegen keine Analysen von DNA- Fragmenten mit anderen NF I - Bindestellen (z.B. Hühnerlysozymgen, MMTV etc.) im Gelretentionstest vor, so daß nicht bekannt ist, ob der in dieser Arbeit beschriebene Bindungsmechanismus allgemeingültig ist.

5.4. Gewebsspezifische Abhängigkeit der NF I - Menge

Kernextrakte aus Leber, Hirn und Milz der Maus wurden auf ihren Gehalt von NF I getestet. Wie erwartet, konnte ein Protein mit NF I - spezifischer Bindungsaktivität in allen drei Organen identifiziert werden. Dabei enthielten die Extrakte aus Leber - und Hirnkernen in Bezug auf die bestimmte Gesamtproteinkonzentration etwa gleiche Mengen an NF I. Auch von Borgmeyer und Mitarbeitern durchgeführte Untersuchungen zum Vergleich der Menge des TGGCA - Proteins in Kernextrakten aus Hühnerlebern und -hirnen lieferten das gleiche Resultat (Borgmeyer et al., 1984).

Da sich Gehirnzellen in weitaus geringerem Ausmaß teilen als Zellen in anderen Geweben, hätte man sehr viel weniger NF I in diesen Extrakten erwartet, falls es sich bei NF I um einen ausschließlich an der DNA - Replikation beteiligten Faktor handeln würde. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, daß NF I zusätzlich zur bekannten stimulierenden Aktivität bei der Adenovirus - Replikation weitere regulatorische Funktionen, z.B. bei Transkriptions - und / oder Rekombinationsprozessen in der Zelle erfüllt.

In Milzkernextrakten dagegen lag der Anteil an NF I etwa um den Faktor 5 - 10 unter dem in den anderen untersuchten Organen. Da eine wesentliche Funktion der Milz der Abbau von Erythrozyten und anderen Bestandteilen des Bluts ist, erwartet man dort eine erhöhte Proteaseaktivität. Diese könnte zu einer Degradation von NF I in der Milz führen und so die geringere Menge des Proteins in diesem Extrakt erklären.

5.3. Funktionelle Aspekte

Die Termini der menschlichen Adenoviren enthalten zwischen Position 25 und 40 eine NF I - Bindestelle, deren Bedeutung für die DNA - Replikation nachgewiesen ist. Die Bindung von NF I an diese Region stimuliert die Bildung des Initiationskomplexes und eine begrenzte Elongation. Der Mechanismus, wie NF I seine Funktion ausübt, ist unbekannt. Das Protein könnte entweder mit anderen an der Replikation beteiligten Proteinen in Wechselwirkung treten und damit z.B. deren Affinität für konservierte Sequenzen im Replikationsursprung erhöhen. Alternativ könnte NF I eine Entwindung der DNA - Helix im Bereich des Replikationsursprungs bewirken oder die DNA - Struktur so verändern, daß Interaktionen mit anderen Replikationsfaktoren ermöglicht werden (Leegwater et al., 1985).

Da die Replikationsvorgänge in menschlichen Adenoviren und in AdFL nach dem gleichen Muster ablaufen (Temple et al., 1981), ist anzunehmen, daß NF I auch auf die AdFL - Replikation einen stimulierenden Einfluß ausübt. Das Vorkommen von NF I - Bindestellen innerhalb des ITR's von AdFL legt einen mit den menschlichen Adenoviren vergleichbaren Replikationsmechanismus nahe. Allerdings befindet sich die Erkennungsstelle für NF I im Mäusevirus 20 bp weiter in 3'- Richtung vom Replikationsursprung entfernt als bei Ad2 und Ad5. Solange die genaue Größe des Proteins und die Form, in der es an DNA bindet, noch nicht endgültig aufgeklärt sind, wird es nicht möglich sein, mit Sicherheit zu sagen, ob NF I seine Funktion durch Interaktion mit dem pTP / AdPol - Komplex ausübt oder durch Veränderung der DNA - Struktur. Genausowenig lassen sich Aussagen darüber machen, ob die Distanz der NF I - Bindestelle zum Replikationsstart eine Rolle für den Mechanismus der NF I - Funktion spielt.

Während davon ausgegangen werden kann, daß die Bindung von NF I an die Erkennungssequenz im ITR von AdFL funktionell mit der Bindung an die entsprechenden Sequenzen von Ad2 und Ad5 gleichzusetzen ist, ist die Funktion der NF I - Bindestelle außerhalb der terminalen Repetition von AdFL vollkommen unbekannt. Obwohl ein stimulierender Effekt auf die DNA-Replikation nicht ausgeschlossen werden kann, scheint ein solcher eher

unwahrscheinlich. Da die Bindestelle nur im rechten Ende von AdFL gefunden wurde, könnte eine zusätzliche Stimulierung der Replikation durch die Bindung eines weiteren Moleküls NF I zu einem unsymmetrischen Replikationsverlauf führen, d.h. die Replikation ausgehend vom rechten Ende würde effizienter verlaufen als vom linken Ende. Durch den Einsatz klonierter AdFL - Fragmente, die sowohl eine als auch beide NF I - Bindestellen enthalten, in einem in vitro - Replikationssystem, könnte der Einfluß der zweiten Bindestelle auf die Effizienz der Replikation getestet werden.

Die Stimulierung der DNA - Replikation scheint jedoch nicht die einzige Funktion von NF I zu sein. Das Vorkommen von NF I - Bindestellen in regulatorischen Bereichen zahlreicher Gene (c-myc, Hühnerlysozymen etc., s.a. Einleitung) spricht für eine universellere Rolle von NF I. Auf Grund der Korrelation von NF I - Bindestellen mit hypersensitiven Bereichen auf der DNA, wird von verschiedenen Arbeitsgruppen vermutet, daß NF I an der Entstehung und / oder Aufrechterhaltung eines aktiven Zustands des Chromatins beteiligt ist und so die Expression des entsprechenden Gens beeinflusst (Nowock et al., 1985; Hennighausen und Fleckenstein, 1986; Hennighausen et al., 1985).

Über den Aufbau des Genoms von AdFL ist nur sehr wenig bekannt und wie bereits erwähnt, existiert bisher keine Transkriptionskarte des Virus. Daher kann man nur mutmaßen, daß die NF I - Bindestelle außerhalb des ITR eventuell in einer regulatorisch bedeutsamen Region des Genoms liegen könnte und dort eine bestimmte, bisher unbekannte Funktion erfüllt. Wegen der hohen Affinität von NF I für diese Sequenz ist es unwahrscheinlich, daß diese Bindestelle keine Bedeutung für das Virus hat. Die Erstellung einer Transkriptionskarte könnte in der Zukunft die Funktion von NF I für diesen Bereich des Virus erhellen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das zelluläre Protein Nuklearfaktor I stimuliert die DNA - Replikation in menschlichen Adenoviren durch sequenzspezifische Bindung an eine Region innerhalb der umgekehrten terminalen Repetition.

In der vorliegenden Arbeit konnten Bindestellen für dieses Protein auch im Genom des Mausadenovirus Serotyps FL identifiziert werden. Zusätzlich zu der bei den menschlichen Adenoviren vorkommenden Bindestelle innerhalb des ITR wurde mit Hilfe der Exonuklease III- Footprint - Analyse eine weitere Bindestelle im rechten Ende von AdFL, 30 bp außerhalb der Repetition, nachgewiesen. Zur Charakterisierung einiger Bindungseigenschaften von NF I an Hand der beiden Bindestellen im AdFL - Genom wurde in erster Linie die Technik des Gelretentionstests angewendet.

Wie durch Affinitätsuntersuchungen mit 40 bp langen Oligonukleotiden gezeigt wurde, wies NF I für die beiden Bindestellen unterschiedliche Affinitäten auf, wobei für die Bindestelle außerhalb des ITR eine deutlich höhere Affinität festgestellt wurde.

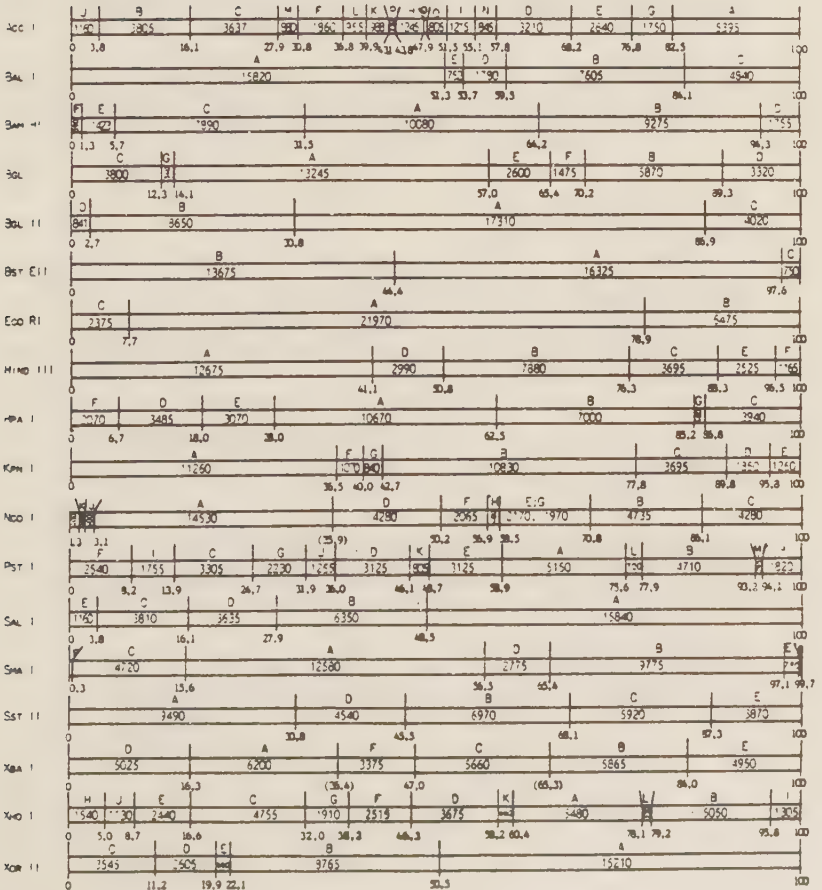
Ein möglicher Einfluß von flankierenden Sequenzen der NF I - Erkennungs - stelle auf die Bindung des Proteins wurde mit klonierten Endfragmenten von AdFI getestet. Diese, zwischen 100 und 220 bp langen DNA - Fragmente zeigten im Vergleich zu den Oligonukleotiden ein komplexeres Bindungsverhalten. Es wird daher ein Bindungsmechanismus postuliert, bei dem NF I in oligomerer Form, vermutlich als Tetramer, an die rotationssymmetrische Erkennungssequenz bindet. Dazu scheinen DNA - Sekundärstrukturen erforderlich zu sein, die von kurzen Oligonukleotiden auf Grund fehlender flankierender Sequenzen nicht ausgebildet werden können.

Die mögliche Bedeutung der beiden NF I - Bindestellen im AdFL - Genom für das Virus wird diskutiert. Das Vorkommen des Proteins in einem so wenig teilungsaktiven Gewebe wie dem Gehirn und die Identifizierung von Bindestellen in vermutlich an der Transkriptionskontrolle beteiligten Genbereichen schließt eine ausschließlich mit der DNA - Replikation gekoppelte Funktion von NFI aus.

7. ANHANG

7.1. Restriktionskarte von Mausadenovirus FL

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind in Längeneinheiten (map units) von 1 - 100 angegeben, die Fragmentgrößen in Basenpaaren. (aus Antoine, 1984)



7.2. DNA - Sequenz der Enden von Mausadenovirus FL

(aus Antoine, 1984)

Linkes Ende (pGA 1127)

CCCGGGGATCGGTCATCA¹CAATAATATACAGTTAGCAAAAAATGGCGCC
 GGGCCCCTAGGCAGGTAGTAGTTATTATATGTCAATCGTTTTTTACCGCGG

10 20 30

TTTGTTTGGCTTTGTTCCAAGTGTGTTTGGCCCGAGTTGGGTTTCGTT
 AAACAAACCGAAACAAGGTTGACAAAAACCGGGCTCAACCCAAAGCAA

40 50 60 70 80

↓

TTCCCGGGTTTCACGTGGTGCGTCAGGTGATGTTGAGTTTTATACAT
 AAGGGCCCAAAGTGCACCACGCAGTCCACTACAAC¹TCAAAAAATATGTA

90 ↑ 100 110 120 130

GTTTGTGTGTGTTTTGT
 CAAACACACAAAAACA

140 150

Rechtes Ende (pGA 613)

ATTCCCATCATCAATAATATACAGTTAGCAAAAAATGGCGCCTTTG
 GGGGTAGTAGTTATTATATGTCAATCGTTTTTTACCGCGGAAAC

10 20 30 40

TTTGGCTTTGTTCCAAGTGTGTTTGGCCCGAGTTGGGTTTCGTTT
 AAACCGAAACAAGGTTGACAAAAACCGGGCTCAACCCAAAGCAAAA

50 60 70 80

↓

CCCGGGAATGACGTGTGAAAAGGGTCTGGGGGCTTTTGGCACTGTG
 GGGCCCTTACTGCACACTTTTCCAGACCCCCGAAAACCGTGACAC

90 ↑ 100 110 120 130

CCAAGTGTGTTGTG
 GGTTGACACAACAC

140

L I T E R A T U R

- Antoine, G.; Aleström, P.; Schilling R.; Petterson, U. and Winnacker, E.L. (1982)
Selective expression of mouse adenovirus FL in human cells
The EMBO J. 1, 453 - 459
- Antoine, G. (1984)
Replikation und Expression von Mausadenovirus FL
Dissertation, Institut für Biochemie der Universität München
- Arai, K. and Kornberg (1981)
Mechanism of dnaB protein action. III. Allosteric role of ATP in the alteration of DNA structure by dnaB protein in priming replication
J. Biol. Chem. 256, 5260 - 5266
- Bradford, M.M. (1976)
A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein - Dye Binding
Anal. Biochem: 72, 248 - 254
- Borgmeyer, U.; Nowock, J. and Sippel, A.E. (1984)
The TGGCA - binding protein: a eukariotic nuclear protein recognizing a symmetrical sequence on double - stranded linear DNA
Nucl. Acids Res. 12, 4295 - 4311
- Challberg, M. D. and Kelly Jr., T.J. (1979)
Adenovirus DNA replication in vitro
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 655 - 659
- Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y. and Hsu, C. (1972)
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E.coli* by R - factor DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 - 2114
- Dubnick, M.; Chou, J.; Petes, T.D. and Farber, R.A. (1983)
Relationships Among DNA Sequences of the 1.3 kb Eco RI Family of Mouse DNA
J. Mol. Evol. 19, 115 - 121

- Dugaiczik, A.; Boyer, H.W. and Goodman, H.M. (1975)
Ligation of Eco RI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures *J. Mol. Biol.* 96, 171 - 184
- Dulbecco, R. and Freeman, G. (1959)
Plaque production by the polyoma virus
Virology 8, 396 - 397
- Flint, S.J. (1981)
in "DNA Tumour Viruses"
Tooze, J. (ed) Second edition,
Cold Spring Harbor Laboratory 383 - 442
- Fried, M. and Crothers, D.M. (1981)
Equilibria and kinetics of lac repressor - operator interaction by polyacrylamide gel electrophoresis
Nucl. Acids. Res. 9, 6505 - 6524
- Fried, G.M. and Crothers, D.M. (1984)
Equilibrium Studies of the Cyclic AMP Receptor Protein - DNA Interaction
J. Mol. Biol. 172, 241 - 262
- Fütterer, J. and Winnacker, E.L. (1984)
Adenovirus DNA replication
Current Topics in Microbiology and Immunology 111, 41 - 64
- Galas, D.J. and Schmitz, A. (1978)
DNAse footprinting: a simple method for the detection of protein DNA binding specificity
Nucl. Acids Res. 6, 3157 - 31
- Garner, M.M. and Rezvin, A. (1981)
A gelelectrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system
Nucl. Acids Res. 9, 3047 - 3060
- Graves, B.J.; Johnson P.F. and McKnight, S.L. (1986)
Homologous Recognition of a Promoter Domain Common to the MSV LTR and the HSV tk Gene
Cell 44, 565 - 576

- Green, M.; Mackey, J.H.; Wold, W.S.M. and Rigden, P. (1979)
Thirty - one human adenovirus serotypes (Ad 1 - 31) form five groups
(A - E) based upon DNA genome homologies
Virology 93, 481 - 492
- Gronostajski, R.M.; Nagata, K. and Hurwitz, J. (1984)
Isolation of human DNA sequences that bind to nuclear factor I, a host
protein involved in adenovirus DNA replication
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4013 - 4017
- Gronostajski, R.M.; Adhya, S.; Nagata, K.; Guggenheimer, R.A. and
Hurwitz, J. (1985)
Site - Specific DNA Binding of Nuclear Factor I: Analyses of Cellular
Binding Sites
Mol. Cell. Biol. 5, 964 - 971
- Grunstein, M. and Hogness, D.S. (1975)
Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that
contain a specific gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 - 3965
- Guggenheimer, R.A.; Stillman, B.W.; Nagata, K.; Tamanoi, F. and
Hurwitz, J. (1974)
DNA sequences required for the *in vitro* replication of adenovirus DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3069 - 3073
- Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids
J. Mol. Biol. 166, 557 - 580
- Hartley, J. W. and Rowe, W.P. (1960)
A new mouse virus apparently related to the adenovirus group
Virology 11, 645 - 647
- Hay, R.T. (1985)
The origin of DNA replication: minimal DNA sequence requirement
in vivo
The EMBO J. 4, 421 - 426
- Heinrich, P. (1986)
Guidelines for quick and simple Plasmid Sequencing
Boehringer Mannheim GmbH Biochemica

- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1983)
Electrophoresis Forum '83, Radola B.J. ed. München pp 92 - 97
- Hennighausen, L.; Siebenlist, U.; Danner, D.; Leder, P.; Rawlins, D.;
Rosenfeld, P. and Kelly Jr., T. J. (1985)
High - affinity binding site for a specific nuclear protein in the human
IgM gene
Nature 314, 289 - 292
- Hennighausen, L. and Fleckenstein, B. (1986)
Nuclear Factor I interacts with five DNA elements in the promoter
region of the human cytomegalovirus major immediate early gene
The EMBO J. 5, 1367 - 1371
- Hilleman, M.R. and Werner, J.H. (1954)
Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 183 - 188
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981)
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids
Anal. Biochem. 114, 193 - 197
- Ikeda, J.E.; Enomoto, T. and Hurwitz, J. (1981)
Replication of adenovirus DNA - protein complex with purified proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 884 - 888
- Larsen, S.H. and Nathans, D. (1977)
Mouse adenovirus: growth of plaque - purified FL virus in cell lines
and characterization of viral DNA
Virology 82, 182 - 195
- Larsen, S.H.; Margolshee, R.F. and Nathans, D. (1979)
Alignment of the restriction map of mouse adenovirus FL with that of
human adenovirus 2
Virology 97, 406 - 414
- Lechner, R.L. and Kelly, T.J. (1977)
The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules
Cell 12, 1007 - 1020

- Leegwater, P.A.J.; van Driel, W. and van der Vliet, P.C. (1985)
Recognition site of nuclear factor I, a sequence - specific DNA - binding protein from HeLa cells that stimulates adenovirus DNA replication
The EMBO J. 4, 1515 - 1521
- Leegwater, P.A.J.; van der Vliet, P.C.; Rupp, R.A.W.; Nowock, J. and Sippel, A.E. (1986)
Functional homology between the sequence - specific DNA - binding proteins nuclear factor I from HeLa cells and the TGGCA protein from chicken liver
The EMBO J. 5, 381 - 386
- Low, R. and Holden, J. (1985)
Inhibition of HeLa cell DNA topoisomerase I by ATP and phosphate
Nucl. Acids Res. 13, 6999 - 7014
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning. A Laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977)
A new method for sequencing DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 - 564
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980)
Sequencing end - labeled DNA with base - specific cleavages
Methods Enzymol. 65, 499 - 560
- Nagata, K.; Guggenheimer, R.A.; Enomoto, T.; Lichy, J.H. and Hurwitz, J. (1982)
Adenovirus DNA replication in vitro: Identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein - dCMP complex
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6438 - 6442
- Nagata, K.; Guggenheimer, R.A. and Hurwitz, J. (1983)
Adenovirus DNA replication in vitro: Synthesis of full - length DNA with purified proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4266 - 4270
- Nagata, K.; Guggenheimer, R.A. and Hurwitz, J. (1983)
Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6177 - 6181

- Nowock, J.; Borgmeyer, U.; Püschel, A.W.; Rupp, R.A.W. and Sippel, A.E. (1985)
The TGGCA protein binds to the MMTV - LTR, the adenovirus origin of replication, and the BK virus enhancer
Nucl. Acids Res. 12, 4295 - 4311
- Prujin, G.J.M.; van Driel, W. and van der Vliet, P.C. (1986)
Nuclear factor III, a novel sequence - specific DNA - binding protein from HeLa cells stimulating adenovirus DNA replication
Nature 322, 656 - 659
- Rawlins, D.R.; Rosenfeld, P.J.; Wides, R.J.; Challberg, M.D. and Kelly Jr., T.J. (1984)
Structure and Function of the Adenovirus Origin of Replication
Cell 37, 309 - 319
- Rekosh, D.M.K., Russel, W.C.; Bellet, A.J.D. and Robinson, A.J. (1977)
Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA
Cell 11, 283 - 295
- Riggs, D.A.; Bourgeois, S.; Newby, R.F. and Cohn, M. (1968)
DNA binding of the lac repressor
J. Mol. Biol. 34, 365 - 368
- Riggs, D.A.; Suzuki, H. and Bourgeois, S. (1970)
Lac repressor operator interactions
J. Mol. Biol. 48, 67 - 83
- Rosenfeld, P.J. and Kelly, T.J. (1986)
Purification of Nuclear Factor I by DNA Recognition Site Affinity Chromatography
J. Biol. Chem. 261, 1398 - 1408
- Rowe, W.P.; Huebner, R.J.; Gillmore, L.K.; Parrot, R.H. and Ward, T.G. (1953)
Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84, 570 - 573
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain - terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 - 5467

- Schneider, R.; Gander I.; Müller, U.; Mertz, R. and Winnacker, E.L. (1986)
A sensitive and rapid gelretention assay for nuclear factor I and other
DNA - binding proteins in crude nuclear extracts
Nucl. Acids Res. 14, 1303 - 1317
- Siebenlist, U.; Hennighausen, L., Battey, J. and Leder, P. (1984)
Chromatin Structure and Protein Binding in the Putative Regulatory
Region of the c-myc Gene in Burkitt Lymphoma
Cell 37, 381 - 391
- Southern, E. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel
electrophoresis
J. Mol. Biol. 98, 503 - 517
- Southern, E. (1980)
Gel electrophoresis of restriction fragments
Methods Enzymol. 68, 152 - 182
- Tamanoi, F. and Stillman, B.W. (1983)
The origin of adenovirus DNA replication
Current Topics in Microbiology and Immunology 109, 75 - 87
- Takeda, Y.; Ohlendorf, D.H.; Anderson, W.F. and Matthews, B.W. (1983)
DNA - Binding Proteins
Science 221, 1020 - 1026
- Theisen, M.; Stief, A. and Sippel, A. (1986)
The lysozyme enhancer: cell - specific activation of the chicken
lysozyme gene by a far - upstream DNA element
The EMBO J. 5, 719 - 724
- Tjian, R.; Briggs, M.; Mitchell, P.; Lee, W.; Kadonaga, J. and
Jones, K. (1986)
Interplay of multiple sequence - specific transcription factors within the
SV 40 promoter and enhancer elements
Tumor Virus Meeting on SV 40, Polyoma and Adenoviruses
Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Temple, M.; Antoine, G.; Delius, H.; Stahl, S. and Winnacker, E.L. (1981)
Replication of Mouse Adenovirus Strain FL DNA
Virology 109, 1 - 12

- Vieira, J. and Messing, J. (1982)
The pUC - plasmids, a M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers
Gene 19, 259 - 268
- de Vries, E.; van Driel, W.; Tromp, M.; van Boom, J. and van der Vliet, P.C. (1985)
Adenovirus DNA replication *in vitro*: site - directed mutagenesis of the nuclear factor I binding site of the Ad2 origin
Nucl. Acids Res. 13, 4935 - 4952
- Vogt, B. (1986)
Allosterische Kontrolle der Bindung von T - Antigen an SV 40 - DNA durch Purinnukleosidtriphosphate
Dissertation, Institut für Biochemie der Universität München
- Wallace, R.B.; Jokuson, M.J.; Suggs, S.V.; Miyosky, K.; Bhatt, R. and Itakura, K. (1981)
A set of oligodeoxynucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR 322
Gene 16, 21 - 26
- Wieslander, L. (1979)
A Simple Method to Recover Intact High Molecular Weight RNA and DNA after Electrophoretic Separation in Low Gelling Temperature Agarose Gels
Anal. Biochem. 98, 305 - 309
- Wigand, R.; Gelderblom, H. and Ozel, M. (1977)
Biological and biophysical characterization of mouse adenovirus strain FL
Arch. Virol. 54, 131 - 142
- Winter, R.B. and von Hippel, P.H. (1981)
Diffusion - Driven Mechanism of Protein Translocation of Nucleic Acids. 2. The *Escherichia coli* Repressor Operator Interaction: Equilibrium Measurements
Biochemistry 20, 6948 - 6960
- Wishart, W.; Broach, J. and Ohtsubo, E. (1985)
ATP - dependent specific binding of Tn3 transposase to Tn3 inverted repeats
Nature 314, 556 - 558

Wu, C. (1985)

An exonuclease protection assay reveals heat - shock element and
TATA box DNA - binding proteins in crude nuclear extracts
Nature 317, 84 - 87

LEBENS LAUF

Name:	Angelika H u b e r - M a c k, geb. Huber
Geburtsdatum:	05.02. 1955
Geburtsort:	München
Eltern:	Hanns Huber Josefine Huber, geb. Buschsieweke
Familienstand:	verheiratet
Schulbildung:	
1961 - 1965	Volksschule Krailling
1965 - 1974	Kurt - Huber - Gymnasium Gräfelfing
1974	Abitur
Studium:	
Nov.1974	Beginn des Biologiestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Sept.1976	Diplom - Vorprüfung
April 1980	Diplom - Hauptprüfung
Sept. 1980 - Sept. 1981	Diplomarbeit: "Rekombinationsereignisse bei Adenoviren" am Institut für Biochemie der Universität München unter Anleitung von Prof.Dr. E.-L. Winnacker
März 1982 - Okt. 1986	Doktorarbeit am selben Institut "Identifizierung und Charakterisierung von Nuklearfaktor I - Bindestellen im Genom des Mausadenovirus AdFL"

